

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Filipa Antunes da Fonseca

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

LISBOA, 2011

ÍNDICE

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO

<u>RESUMO</u>	8
<u>ABSTRACT</u>	9
<u>INTRODUÇÃO</u>	10
 <u>MICROBIOLOGIA</u>	 12
1. INTRODUÇÃO	12
2. CICLO DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO	13
2.1 Fase Pré-Analítica	13
2.2 Fase Analítica.....	14
2.3 Fase Pós-Analítica.....	23
3. TRACTO RESPIRATÓRIO SUPERIOR	24
3.1 Colheita	25
3.2 Procedimento Laboratorial.....	25
4. TRACTO RESPIRATÓRIO INFERIOR	27
4.1 Colheita	28
4.2 Procedimento Laboratorial.....	28
4.3 Tuberculose	32
5. TRACTO GASTROINTESTINAL	34
5.1 Colheita	35
5.2 Procedimento Laboratorial.....	35
5.3 Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes	38
6. TRACTO URINÁRIO	39
6.1 Colheita	40
6.2 Procedimento Laboratorial.....	42
7. TRACTO GENITAL	45
7.1 Colheita	46
7.2 Procedimento Laboratorial.....	47
8. SISTEMA NERVOSO CENTRAL	50
8.1 Colheita	51
8.2 Procedimento Laboratorial.....	51
9. FERIDAS E ABCESSOS	54
9.1 Colheita	54
9.2 Procedimento Laboratorial.....	54

10. OLHO	56
10.1 Colheita	57
10.2 Procedimento Laboratorial	57
11. SANGUE	59
11.1 Colheita	60
11.2 Procedimento Laboratorial	61
12. PESQUISA DE MICRORGANISMOS MULTI-RESISTENTES.....	64
12.1 MRSA.....	64
12.2 Produtores de ESBL	66
13. IDENTIFICAÇÃO E SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	68
13.1 Sistemas Automáticos	68
13.2 Técnicas Manuais	69
<u>IMUNOLOGIA</u>	72
1. INTRODUÇÃO	72
2. QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	73
2.1 Aparelhos	73
2.2 Alergologia.....	81
2.3 Endocrinologia	82
2.4 Marcadores de Anemia.....	87
2.5 Marcadores Tumorais.....	88
2.6 Doenças Infecciosas	89
2.7 Auto-Imunidade	95
3. RADIOIMUNOENSAIO.....	97
3.1 Testosterona Livre.....	98
3.2 Aldosterona	98
3.3 17- α -Hidroxiprogesterona	99
3.4 Anticorpos Anti-Receptor da TSH.....	99
4. TÉCNICAS MANUAIS.....	100
4.1 Auto-Imunidade	100
4.2 Diagnóstico Serológico de Infecções	103
4.3 Imunocromatografia	106
5. PROTEÍNAS	108
5.1 Electroforese das Proteínas	108
5.2 Imunofixação das Imunoglobulinas	112
5.3 Pesquisa de Proteínas de Bence-Jones	114
5.4 Gamapatias Monoclonais	115
6. HEMOGLOBINA.....	118
6.1 Electroforese das Hemoglobinas	118

<u>HEMATOLOGIA</u>	120
1. INTRODUÇÃO	120
2. PRODUTO BIOLÓGICO	121
2.1 Anticoagulantes	122
2.2 Amostras	123
3. TÉCNICAS MANUAIS	124
3.1 Esfregaço de Sangue	124
4. TÉCNICAS AUTOMATIZADAS	126
4.1 Contadores Hematológicos	126
4.2 Velocidade de Sedimentação	130
4.3 Coagulação	132
5. ALGUMAS PATOLOGIAS	138
5.1 Alterações Morfológicas dos Eritrócitos	138
5.2 Anemia	141
5.3 Hemoglobinopatias	143
5.4 Alterações dos Leucócitos	144
5.5 Alterações da Hemostase	147
<u>CONTROLO DE QUALIDADE</u>	150
1. FUNDAMENTO	150
1.1 CQI	150
1.2 AEQ	155
<u>CONCLUSÃO</u>	157
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	158
1. FOTOGRAFIAS	158
2. LIVROS	158
3. WEBSITES	159
4. FOLHETOS INFORMATIVOS	160
5. OUTROS	161

PARTE II – MONOGRAFIA

<u>RESUMO</u>	163
<u>ABSTRACT</u>	164
<u>INTRODUÇÃO</u>	165
1. CLASSIFICAÇÃO	167
1.1 Cistite e Pielonefrite	167
1.2 ITU não complicada e ITU complicada	167
1.3 ITU sintomática e Bacteriúria assintomática	168
1.4 ITU de repetição	168
2. GRUPOS DE RISCO	169
2.1 Crianças	169
2.2 Sexo feminino	169
2.3 Gravidez	171
2.4 Menopausa	172
2.5 Sexo masculino	172
2.6 Idosos	173
2.7 Algaliação	173
2.8 Lesões na espinal medula	175
2.9 Diabetes <i>mellitus</i>	175
2.10 Esclerose Múltipla e HIV	176
3. PATOGÉNESE / INTERACÇÃO HOSPEDEIRO-MICRORGANISMO	177
3.1 Factores de risco	178
3.2 Factores do meio	179
3.3 Defesas constitutivas	179
3.4 Imunidade inata	180
3.5 Imunidade adaptativa	181
3.6 Estratégias de evasão e Factores de virulência	182
4. ETIOLOGIA	183
4.1 ITUs não complicadas	183
4.2 ITUs complicadas	183
4.3 Outros grupos de risco	183
5. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	185
5.1 Patogénese	185
5.2 Estratégias de evasão e Factores de virulência	186
6. ANTIBIOTERAPIA	188
6.1 Resistências	188
6.2 ITUs não complicadas	189
6.3 ITUs complicadas	192
6.4 Vacinas e Probióticos	195
6.5 Novas abordagens	196

7. INFECCÕES FÚNGICAS.....	198
8. PROJECTO ECO•SENS.....	199
9. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA – FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA	201
9.1 Susceptibilidade aos antibióticos em 2008 e 2010.....	201
9.2 Bactérias uropatogénicas na comunidade em 2010.....	205
10. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA – HOSPITAL DOS SAMS.....	209
<u>CONCLUSÃO</u>.....	212
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	213
1. ARTIGOS	213
2. LIVROS.....	215
3. OUTROS	215

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

HOSPITAL DOS SERVIÇOS DE ASSISTÊNCIA MÉDICO-SOCIAL
SINDICATO DOS BANCÁRIOS SUL E ILHAS

ORIENTAÇÃO:

Doutora Ana Bela Correia
Doutora Maria Luísa Gonçalves
Doutora Ana Maria Lory
Doutora Maria Edite Ribeiro

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Filipa Antunes da Fonseca

LISBOA, 2011

RESUMO

O estágio profissionalizante no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas decorreu no hospital dos SAMS, na unidade de Patologia Clínica, nas valências de Microbiologia, Imunologia e Hematologia, no período de 2 de Fevereiro a 15 de Julho de 2011.

A unidade de Patologia Clínica, coordenada pela Dr^a Ana Bela Correia (Médica Coordenadora de Patologia Clínica), encontra-se equipada para a realização de análises clínicas nas valências de Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia, e é suportada por uma equipa de médicos e de técnicos de diagnóstico. Estabelece acordos externos com centros de referência para a realização de análises raras e especializadas. Do ponto de vista técnico dispõe de equipamentos de última geração nas diferentes valências. A sua produção anual atinge cerca de um milhão de análises por ano.

Esta unidade tem como principais objectivos confirmar, estabelecer ou descartar um diagnóstico, controlar uma terapêutica, realizar exploração selectiva na detecção de uma patologia, e estabelecer algoritmos para a exploração laboratorial, que ajudam o clínico nos passos sucessivos até ao diagnóstico da patologia.

Neste relatório são primeiramente sumarizadas as principais características do local onde decorreu o estágio. De seguida são apresentados os procedimentos executados em cada valência, bem como o fundamento teórico e interesse clínico destes. Por fim, são apresentadas as estratégias de controlo de qualidade utilizadas em cada valência.

ABSTRACT

The internship for the Clinical Analysis Master was held in SAMS's hospital, in the Clinical Pathology's unit, in the areas of Microbiology, Immunology and Hematology, since February 2nd to July 15th, 2011.

The Clinical Pathology's unit, monitored by Dr. Ana Bela Correia (Clinical Pathology medical coordinator), is equipped for the execution of clinical analysis in the areas of Hematology, Biochemistry, Immunology and Microbiology, and is supported by a staff of doctors and diagnostic technicians. It establishes external agreements with reference laboratories for the execution of less common and more specialized analysis. From the technical point of view, it has last generation equipments in all the areas. It's annual production reaches about one million analysis per year.

This unit's main goals are to confirm, stipulate or eliminate a clinical diagnosis, to control a therapy, to perform selective scanning for the detection of a pathology, and to establish algorithms for the laboratory scanning, helping the physician to reach the clinical diagnosis of the pathology.

This report starts by summarizing the main characteristics of the intership site. Afterwards it presents the procedures performed in each area, as well as their theoretical basis and clinical interest. In the end, it presents the quality control strategies used in each area.

INTRODUÇÃO

Os SAMS, Serviços de Assistência Médico-Social do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas (SBSI), asseguram aos seus beneficiários a protecção na saúde através da prestação interna de cuidados de saúde. Esta é desenvolvida em várias instalações incluindo um centro clínico de ambulatório, vinte postos clínicos, um hospital e um lar de idosos.

O hospital foi inaugurado em Setembro de 1994 e encontra-se em funcionamento desde Novembro do mesmo ano. Dispõe de 121 camas de internamento, um bloco operatório, uma unidade de cuidados intensivos polivalente (UCIP), três unidades de cuidados intermédios, uma maternidade, uma unidade de Neonatologia, uma unidade de Nefrologia e Diálise, meios complementares de diagnóstico e exames especiais, atendimento permanente de adulto, e urgência de Ginecologia/Obstetrícia e Neonatologia.

O Departamento de Patologia agrega três unidades especializadas: Patologia Clínica, Anatomia Patológica e Imunohemoterapia. Encontra-se centralizado no hospital e a ele articula-se uma extensão laboratorial avançada num centro clínico ambulatório para apoio ao diagnóstico imediato e numa rede de postos de colheitas de produtos biológicos em cada um dos postos clínicos e no lar de idosos.

A rotina diária comum às várias valências da unidade de Patologia Clínica inclui:

- Recepção de produtos biológicos colhidos nos vários serviços do hospital, 24h por dia;
- Colheita de produtos biológicos, 24h por dia (com maior concentração de manhã);
- Recepção de produtos biológicos provenientes do centro clínico ambulatório e dos vários postos de colheitas (a meio da manhã e ao início da tarde);
- Triage das amostras, confirmação das requisições de análises (folhas de trabalho do dia), detecção de produtos biológicos em falta e organização do trabalho do dia;
- Processamento das amostras;
- Conservação das amostras.

No que diz respeito ao processamento das amostras, a rotina diária na valência de Microbiologia inclui:

- Processamento microbiológico das amostras (inoculação dos meios de cultura, preparação de lâminas para microscopia, entre outros), conforme estas são recebidas/colhidas;
- Coloração das lâminas preparadas;
- Observação ao microscópio dos exames a fresco e das lâminas coradas;
- Organização dos meios de cultura (colocados a incubar no dia anterior) para observação dos resultados, selecção de testes manuais de caracterização e identificação dos microrganismos, e preparação de suspensões microbianas para processamento no Vitek2 e para execução de antibiogramas e antifungigramas;
- Análise dos resultados obtidos no Vitek2 (relativos às suspensões microbianas preparadas no dia anterior);
- Validação dos resultados.

Por sua vez, a rotina diária na valência de Imunologia inclui:

- Centrifugação das amostras de sangue;
- Manutenção e preparação dos aparelhos;
- Distribuição das amostras e dos controlos pelos aparelhos;
- Controlo do funcionamento dos aparelhos;
- Preparação e execução de técnicas manuais;
- Análise e validação dos resultados obtidos.

Por fim, a rotina diária na valência de Imunologia inclui:

- Centrifugação das amostras de sangue;
- Manutenção e preparação dos aparelhos;
- Distribuição das amostras e dos controlos pelos aparelhos;
- Controlo do funcionamento dos aparelhos;
- Execução e coloração de esfregaços;
- Execução de técnicas manuais;
- Análise e validação dos resultados obtidos.

MICROBIOLOGIA

1. INTRODUÇÃO

O laboratório de Microbiologia tem como principais objectivos identificar e caracterizar os microrganismos responsáveis por síndromes infecciosas que ocorrem no Homem, auxiliar na escolha da terapêutica adequada para a sua resolução, e detectar perfis de maior patogenicidade. Para isso, deve conhecer a flora normal dos vários sistemas do corpo humano, distinguir microrganismos contaminantes de agentes etiológicos, e fornecer informações úteis aos clínicos conjugando a rapidez com a qualidade.

O estágio em Microbiologia foi coordenado pela Dr^a Maria Luísa Gonçalves e decorreu no período de 2 de Fevereiro a 1 de Abril (328h).

2. CICLO DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO

No diagnóstico laboratorial distinguem-se 3 fases: pré-analítica, analítica, e pós-analítica.

2.1 Fase Pré-Analítica

Esta fase tem início no contacto entre o paciente e o clínico, que resulta numa suspeita de diagnóstico do síndrome infeccioso. O clínico requisita meios auxiliares de diagnóstico que, entre outros, podem incluir a pesquisa de microrganismos em produtos biológicos vários (por exame cultural, detecção de antígenos, anticorpos, ácidos nucleicos, entre outros).

A colheita e o transporte são dois passos cruciais nesta fase.

Uma **colheita** incorrecta pode resultar na perda do agente etiológico da infecção e/ou na detecção de microrganismos contaminantes, conduzindo à escolha de uma terapêutica errada ou inapropriada. São ainda de referir outras consequências negativas nomeadamente o aumento desnecessário dos custos, assim como o atraso na resposta ao clínico.

Assim, na colheita de produtos biológicos para processamento microbiológico são necessários alguns cuidados, nomeadamente:

- Contactar apenas com a zona de infecção, minimizando contaminações por tecidos, órgãos ou secreções adjacentes;
- Estabelecer o momento correcto para a colheita, de acordo com o desenvolvimento do processo infeccioso;
- Respeitar a quantidade de produto biológico necessária para as diversas técnicas laboratoriais a desenvolver;
- Utilizar técnicas, material de colheita, recipientes e meios de transporte apropriados (esterilizados, inquebráveis) para uma recuperação mais eficaz dos microrganismos de interesse;
- Efectuar a colheita antes da administração de agentes antimicrobianos;
- Identificar e acondicionar correctamente cada produto biológico colhido.

O transporte apropriado dos produtos biológicos permite conservá-los ao máximo no seu estado original, isto é, sem degradação ou alteração dos seus parâmetros. Por outro lado, evita contaminações entre produtos biológicos e protege o técnico que efectua o transporte.

Assim, no transporte dos produtos biológicos é necessário:

- Usar recipientes fechados e estanques;
- Transportar a requisição da análise fora do recipiente onde é transportado o produto biológico;
- Evitar a exposição a condições ambientais agrestes, como temperaturas extremas (elevadas ou baixas), alterações bruscas de pressão atmosférica ou secagem excessiva;
- Congelar quando se prevê um atraso significativo no seu processamento (necessário apenas para algumas análises);
- Não transportar seringas com agulhas ou recipientes conspurcados no exterior.

Caso os critérios de transporte não sejam cumpridos, são definidas regras de rejeição de produtos biológicos em estado impróprio para processamento microbiológico:

- Ausência de identificação ou da prescrição dos exames pretendidos;
- Ausência de informação clínica;
- Colheita efectuada em recipiente inadequado ou com material incorrecto para os exames pretendidos;
- Conservação em meios inadequados, ou recipientes conspurcados no exterior;
- Não cumprimento das regras definidas pelo laboratório (como a duração do transporte);
- Produtos biológicos cujo exame microbiológico seja comprovadamente inútil.

2.2 Fase Analítica

Esta fase consiste na análise propriamente dita do produto biológico e inclui várias etapas, nomeadamente o exame macroscópico, o exame microscópico directo e corado, o exame cultural, a identificação dos microrganismos e o estudo da sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

2.2.1 Exame Macroscópico

Importa começar pela observação macroscópica do produto biológico, procurando sinais de um processo inflamatório associado à presença de leucócitos, isto é, turvação em fluidos fisiologicamente translúcidos (líquidos cefalorraquidiano, pleural e articular), odor associado à presença de microrganismos anaeróbios ou alteração da consistência normal do produto.

2.2.2 Exame Microscópico

O exame microscópico **directo** (do produto biológico) permite uma avaliação qualitativa da presença de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e microrganismos, sendo útil na análise de lavados broncoalveolares, urinas assépticas, exsudados vaginal, endocervical e uretral, e líquido cefalorraquidiano.

Da mesma forma, o exame microscópico **corado** (do produto biológico) permite avaliar se este é representativo do local de infecção ou se está contaminado com flora comensal de zonas próximas. No laboratório são utilizadas as colorações de Gram, Azul de Metileno e Ziehl-Neelsen. A observação na amostra de determinados microrganismos pode fornecer ao analista um diagnóstico presuntivo, podendo ser útil na selecção do procedimento a seguir.

A coloração de **Gram** é frequentemente utilizada para a observação microscópica de produtos biológicos e de colónias obtidas no exame cultural. Permite distinguir bactérias Gram-positivas, cuja parede tem a capacidade de reter o corante violeta de cristal após descoloração, corando de roxo, de bactérias Gram-negativas, cuja parede não é capaz de reter o corante violeta de cristal após descoloração, corando de vermelho pelo corante de contraste. Na observação microscópica de produtos biológicos, permite também observar a morfologia e organização espacial dos microrganismos, sendo estas sugestivas de diversos grupos. Apesar de haver colorações mais específicas, esta coloração é ainda útil na observação de leveduras (coram de roxo), *Trychomonas vaginalis* e outros parasitas.

A coloração de **Azul de Metileno** é usada em associação com a coloração de Gram. Permite a observação de leucócitos polimorfonucleares (e dos seus núcleos), que ficam corados de azul escuro. Facilita ainda a observação de bactérias Gram-negativas intracelulares (por exemplo, em amostras de líquido cefalorraquidiano com suspeita de meningite bacteriana, nomeadamente *Neisseria meningitidis*), uma vez que o fundo avermelhado da coloração de Gram dificulta a sua observação.

Por fim, a coloração de **Ziehl-Neelsen** é utilizada na pesquisa de bactérias ácido-álcool resistentes (BAAR). É o caso das micobactérias, cuja parede celular é resistente à coloração. Através do calor, a parede celular torna-se capaz de absorver o corante carbol-fucsina, sendo

depois resistente à descoloração por solventes orgânicos fortes como o ácido-álcool. As micobactérias ficam, assim, coradas de vermelho.

2.2.3 Exame Cultural

Segue-se então o exame cultural, que implica:

- Escolher os meios de cultura apropriados para os microrganismos patogénicos mais frequentemente encontrados em cada produto biológico;
- Conhecer a temperatura e atmosfera de incubação óptimas para o crescimento dos microrganismos de interesse;
- Seleccionar as colónias que requerem re-isolamento, testes de identificação adicionais ou testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Os meios de cultura são inoculados com um determinado inóculo do produto biológico, semeados através da técnica de sementeira apropriada, e colocados a incubar na estufa em condições específicas de temperatura, O₂ e CO₂. São usados para o crescimento, isolamento, identificação, quantificação e conservação de microrganismos (Tabela 2.A).

Tabela 2.A – Classificação dos meios de cultura.

Meios de Cultura	Descrição
Não selectivos	- Sem inibidores de crescimento, com nutrientes - Permitem o crescimento de qualquer microrganismo encontrado em produtos biológicos
Selectivos	- Com antibióticos, antifúngicos ou substâncias químicas - Permitem o crescimento de alguns microrganismos em detrimento de outros, cujo crescimento é inibido
Diferenciais	- Com substâncias químicas ou corantes - Permitem distinguir grupos de microrganismos presentes no mesmo inóculo
Enriquecimento	- Com nutrientes - Permitem a multiplicação de microrganismos de interesse que se encontram no produto biológico em baixo inóculo
Transporte	Mantêm a viabilidade dos microrganismos sem que estes se multipliquem
Identificação	Evidenciam características bioquímicas de determinadas espécies, permitindo o seu reconhecimento e identificação
Conservação	Mantêm os microrganismos num estado de vida latente durante um determinado período de tempo

Os meios de cultura podem ser sólidos, semi-sólidos e líquidos. Os meios sólidos permitem a observação de colónias de bactérias ou fungos que se desenvolvem à superfície ou no interior da gelose, com aspectos e cores diferentes que auxiliam na sua identificação. São úteis para a obtenção de culturas puras e observação de reacções bioquímicas específicas. Os meios de cultura semi-sólidos são usados em estudos de mobilidade bacteriana e para o crescimento de bactérias anaeróbias. Os meios de cultura líquidos são usados para o enriquecimento de produtos biológicos de baixo inóculo.

No laboratório são utilizados meios de cultura sólidos e líquidos (Tabelas 2.B, 2.C e 2.D).

Tabela 2.B – Meios de cultura sólidos utilizados no laboratório (da bioMérieux, excepto os indicados).

Meios de Cultura	Características
Sangue	- Meio não selectivo - Permite o isolamento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos - Possui sangue de carneiro que permite a expressão de hemólise (α, β, ou γ), devido à presença de factor X
Chocolate	PolyViteX – meio não selectivo - Permite o isolamento de bactérias fastidiosas, como <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> - Composto por uma base nutritiva enriquecida em factores X (hemina) e V (NAD) provenientes da hemoglobina, e PolyViteX
	PolyViteX VCAT3 – meio selectivo - Permite o isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> em amostras polimicrobianas
	PolyViteX Haemophilus 2 – meio selectivo - Permite o isolamento de <i>Haemophilus</i> spp. em amostras polimicrobianas
CPS	- Meio selectivo diferencial e de identificação (cromogénico) - Permite o isolamento, quantificação e identificação de agentes uropatogénicos (<i>Escherichia coli</i>, <i>Proteus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. e grupo KESC (géneros <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i>)) - Contém substratos específicos das reacções enzimáticas características de cada agente, evidenciadas por cores distintas
Mac Conkey	- Meio selectivo diferencial - Permite o isolamento de bacilos Gram-negativos - Evidencia a fermentação da lactose
Chapman (Manitol salgado)	- Meio selectivo diferencial - Permite o isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. - Evidencia a fermentação do manitol
Hektoen	- Meio selectivo diferencial - Permite o isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. a partir de amostras de fezes - Cor das colónias depende do açúcar fermentado - Evidencia a produção de sulfato de hidrogénio (H_2S)
Campylosel	- Meio selectivo - Permite o isolamento de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> em amostras de fezes
Strepto B (Quilaban)	- Meio selectivo e de identificação - Permite o isolamento e identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> (principalmente em amostras de exsudados vaginais)

Tabela 2.C – Meios de cultura sólidos utilizados no laboratório (da bioMérieux, excepto os indicados) (cont.).

Meios de Cultura	Características
Candida	- Meio selectivo diferencial e de identificação (cromogénico) - Permite o isolamento de leveduras, identificação de <i>Candida albicans</i>, e diferenciação presuntiva de <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida lusitanae</i> e <i>Candida kefyr</i> (principalmente em amostras de exsudados vaginais)
ESBL	- Meio selectivo diferencial e de identificação (cromogénico) - Permite a pesquisa de enterobactérias produtoras de β-lactamases de espectro alargado, e a identificação directa das estirpes mais frequentes
MRSA	- Meio selectivo diferencial e de identificação (cromogénico) - Permite o isolamento e identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, na presença de cefoxitina
Lowenstein-Jensen (Becton, Dickinson and Company)	- Meio selectivo - Permite o isolamento de micobactérias
Mueller-Hinton	- Meio não selectivo - Permite a realização de antibiogramas de bactérias não fastidiosas por difusão - Adicionado de sangue de carneiro, é utilizado para o mesmo fim, mas para bactérias que requerem sangue para o seu crescimento (<i>Streptococcus</i> spp.)
RPMI (Izasa)	- Meio não selectivo - Utilizado para testar a susceptibilidade de fungos a antifúngicos e para a determinação de CMI's (concentração mínima inibitória)

Tabela 2.D – Meios de cultura líquidos utilizados no laboratório.

Meios de Cultura	Características
Brain-Heart-Infusion (BHI) (bioMérieux)	- Meio não selectivo de enriquecimento - Permite a multiplicação de vários microrganismos fastidiosos
Selenito (bioMérieux)	- Meio selectivo de enriquecimento - Permite a multiplicação de <i>Salmonella</i> spp. em detrimento de outros microrganismos
Middlebrook modificado (Becton, Dickinson and Company)	- Meio selectivo de enriquecimento - Permite a multiplicação de micobactérias em detrimento de outros microrganismos
Hemocultura (Becton, Dickinson and Company)	- Meio não selectivo de enriquecimento - Permite a multiplicação de bactérias fastidiosas e não fastidiosas, bem como de fungos leveduriformes, em amostras de sangue

A **inoculação** dos meios de cultura pode ser realizada através de vários métodos e requer o uso de ansas (de níquel ou de plástico descartáveis).

O método dos 4 quadrantes consiste no espalhamento do inóculo inicial num quadrante da gelose, para depois esgotar o material ao longo dos restantes três quadrantes através de estrias largas, de forma a obter colónias isoladas. O inóculo inicial pode ser colocado na gelose através de uma zaragatoa ou da própria ansa.

Para a contagem semiquantitativa de colónias é utilizado outro método, no qual são utilizadas ansas calibradas para efectuar uma estria ao longo de um raio da gelose, e depois o inóculo é espalhado através de estrias apertadas (perpendiculares à primeira) em toda a superfície da gelose.

Segue-se a **incubação** em estufas próprias, respeitando as condições óptimas de crescimento dos microrganismos de interesse (Tabela 2.E).

Tabela 2.E – Condições óptimas de crescimento dos microrganismos patogénicos.

Factor	Condições
Temperatura	▪ 35°C ▪ Estável
Humidade	▪ >70% ▪ Meios de cultura hidratados
Atmosfera (consoante o microrganismo)	▪ Aerofilia ▪ Capnofilia (5-10% CO₂) ▪ Microaerofilia (<5% O₂)
Tempo de incubação	▪ 18-24h ▪ Prolongado por mais 24h (ou mais) para alguns microrganismos fastidiosos

Após a incubação durante o tempo necessário, segue-se a **interpretação** dos resultados:

- Quantificação (em relação ao total) e caracterização (cor, odor, morfologia) de cada tipo de colónia;
- Caracterização da morfologia e reacção de Gram das bactérias encontradas, e pesquisa de estruturas específicas associadas às células (esporos, grânulos, entre outros);
- Observação das modificações ocorridas nos meios de cultura que reflectem actividades metabólicas específicas de cada grupo de microrganismos.

Durante a colheita dos produtos biológicos ou durante o seu manuseamento podem ocorrer contaminações, que se manifestam pelo aparecimento de colónias diferentes das

predominantes. Pode ocorrer também a contaminação dos meios de cultura, evidenciada muitas vezes pelo aparecimento de colónias fora das estrias, ou que não aparecem no primeiro quadrante. Todas estas observações permitem depois seleccionar novos meios de cultura e outros testes que permitam a identificação dos microrganismos relevantes.

2.2.4 Identificação e Susceptibilidade a Agentes Antimicrobianos

São vários os **testes rápidos** que auxiliam na identificação de bactérias (Tabelas 2.F e 2.G).

Tabela 2.F – Testes rápidos utilizados para caracterização de bactérias, durante o estágio.

Teste	Descrição
Catalase	- Colocar parte de uma colónia suspeita sobre umas gotas de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), numa lâmina de vidro - Positivo – efervescência indica a produção de O₂ - Negativo – ausência de efervescência - Distingue: – <i>Staphylococcus</i> spp. – catalase-positivo – <i>Streptococcus</i> spp. – catalase-negativo
Coagulase (em carta de aglutinação) (Pastorex Staph-Plus) (Bio-Rad)	- Dissolver uma colónia de <i>Staphylococcus</i> spp. numa gota de reagente (látex sensibilizado com fibrinogénio e anticorpos monoclonais contra polissacáridos capsulares de <i>Staphylococcus aureus</i>) sobre a carta de aglutinação - Positivo – aparecimento de coágulos - Negativo – não se formam coágulos (confirmar no teste em tubo) - Distingue: – <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase-positivo) – <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo
Coagulase (em tubo) (BBL Coagulase Plasma) (Becton, Dickinson and Company)	- Dissolver algumas colónias suspeitas de <i>Staphylococcus</i> spp. em plasma de coelho rehidratado em tubo - Positivo – a acção da coagulase produzida pelo microrganismo sobre a protrombina do plasma origina um produto semelhante à trombina, e este actua sobre o fibrinogénio para formar fibrina levando à formação de um coágulo - Negativo – não se forma coágulo - Distingue: – <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase-positivo) – <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo
Indol (ID indol) (bioMérieux)	- Uma pequena porção da colónia de interesse obtida em gelose CPS (que contém triptofano) é colocada sobre um papel de filtro embebido na solução de dimetilaminocinamaldeído - Positivo – aparecimento imediato de cor azul, é um resultado presuntivo de <i>Escherichia coli</i> (possui triptofanase que decompõe o triptofano e liberta indol) - Negativo – ausência de cor

Tabela 2.G – Testes rápidos utilizados para caracterização de bactérias, durante o estágio (cont.).

Teste	Descrição
Oxidase (BBL DrySlide Oxidase) (Becton, Dickinson and Company)	- Colocar parte da colónia de interesse sobre a região de uma tira de teste embebida no reagente N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorido - Positivo – aparecimento de cor roxa, indicando que existe actividade de citocromo oxidase - Negativo – ausência de cor - Distingue: – <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Aeromonas</i> spp. (oxidase-positivo) – enterobacteriáceas (oxidase-negativo)
Optoquina (Teste com optoquina) (bioMérieux)	- Semear uma colónia suspeita de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (obtida em gelose sangue) numa gelose de sangue de forma a que o riscado ocupe toda a superfície da gelose; no centro da gelose é depositado um disco de optoquina - Distingue: – <i>Streptococcus pneumoniae</i> (é sensível à optoquina, com halo ≥ 15 mm) – <i>Streptococcus</i> α-hemolítico
Nitrocefín (BBL DrySlide Nitrocefín) (Becton, Dickinson and Company)	- Colocar parte da colónia de interesse sobre um papel de filtro embebido em nitrocefín - Positivo – área de reacção passa de amarela a cor-de-rosa (indica que ocorre produção de β-lactamases) - Negativo – cor da área de reacção mantém-se - Distingue: – Microrganismos produtores de β-lactamases – Microrganismos β-lactamase-negativos

Por fim, existem técnicas manuais e sistemas automatizados que permitem uma rápida e segura identificação de bactérias, assim como o estudo da susceptibilidade a antibióticos (Capítulo 13).

No que diz respeito a fungos leveduriformes, o seu estudo e caracterização são em tudo semelhantes aos procedimentos utilizados para as bactérias (com excepção dos testes rápidos referidos) (Capítulo 13). No caso de fungos filamentosos, é efectuada a caracterização a partir da observação de estruturas de reprodução assexuada. O estudo dos parasitas é efectuado através da caracterização da morfologia dos seus ovos, quistos e formas vegetativas, através de exames a fresco e colorações.

2.3 Fase Pós-Analítica

Nesta fase, o analista prepara os relatórios interpretativos dos resultados obtidos, de forma a auxiliar o clínico a estabelecer um diagnóstico.

No caso de bactérias patogénicas, poderá ser possível indicar uma identificação presuntiva ao fim de 48h após a recolha do produto biológico. Tratando-se de micobactérias ou fungos, uma identificação preliminar poderá demorar semanas.

Seguidamente é referido o procedimento laboratorial por produto biológico, assim como as principais infecções e os agentes patogénicos pesquisados com maior frequência. Os esquemas apresentados demonstram a cronologia da preparação dos vários exames utilizados no processamento de cada produto biológico (e não a cronologia dos resultados obtidos em cada exame).

3. TRACTO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

O tracto respiratório subdivide-se em superior (fossas nasais, faringe, orofaringe e nasofaringe) e inferior (laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares).

A flora normal do tracto respiratório superior é constituída por um grande grupo de microrganismos, dos quais alguns são patogénicos sem, no entanto, provocarem sintomatologia em indivíduos saudáveis. Inclui, entre outros, *Streptococcus* β -hemolíticos, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, bactérias anaeróbicas como *Fusobacterium* spp. e *Actinomyces israelii*, fungos como *Candida albicans*, e vírus como adenovírus e herpes simplex. Indivíduos internados em ambiente hospitalar apresentam um predomínio de bactérias Gram-negativas como enterobacteriaceas e *Pseudomonas* spp.

A faringite aguda é a infecção mais importante do tracto respiratório superior, sendo *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* β -hemolítico do grupo A) o agente patogénico mais importante (pelas consequências que acarreta o não tratamento desta infecção), seguido de *Neisseria gonorrhoeae* e agentes virais (estes últimos são os mais frequentes).

Numa faringite provocada por *Streptococcus pyogenes* observa-se tipicamente a mucosa da faringe inflamada e edematosa, associada a outros sintomas como febre e nódulos linfáticos cervicais aumentados, e ao aparecimento de exsudado purulento na zona das amígdalas e da faringe posterior. Outros *Streptococcus* β -hemolíticos dos grupos C e G provocam sintomas semelhantes mas menos acentuados, e constituem colonizadores frequentes da orofaringe, sendo mais difícil interpretar a sua presença nesta região. De qualquer das formas, a sua detecção é sempre transmitida ao clínico.

A faringite gonocócica é uma infecção da orofaringe geralmente assintomática provocada por *Neisseria gonorrhoeae*, um agente patogénico transmitido por via sexual, mas pode existir sintomatologia e pode estar associada a doença disseminada. É necessário que haja o conhecimento no laboratório da suspeita por parte do clínico de forma a que este microrganismo seja pesquisado.

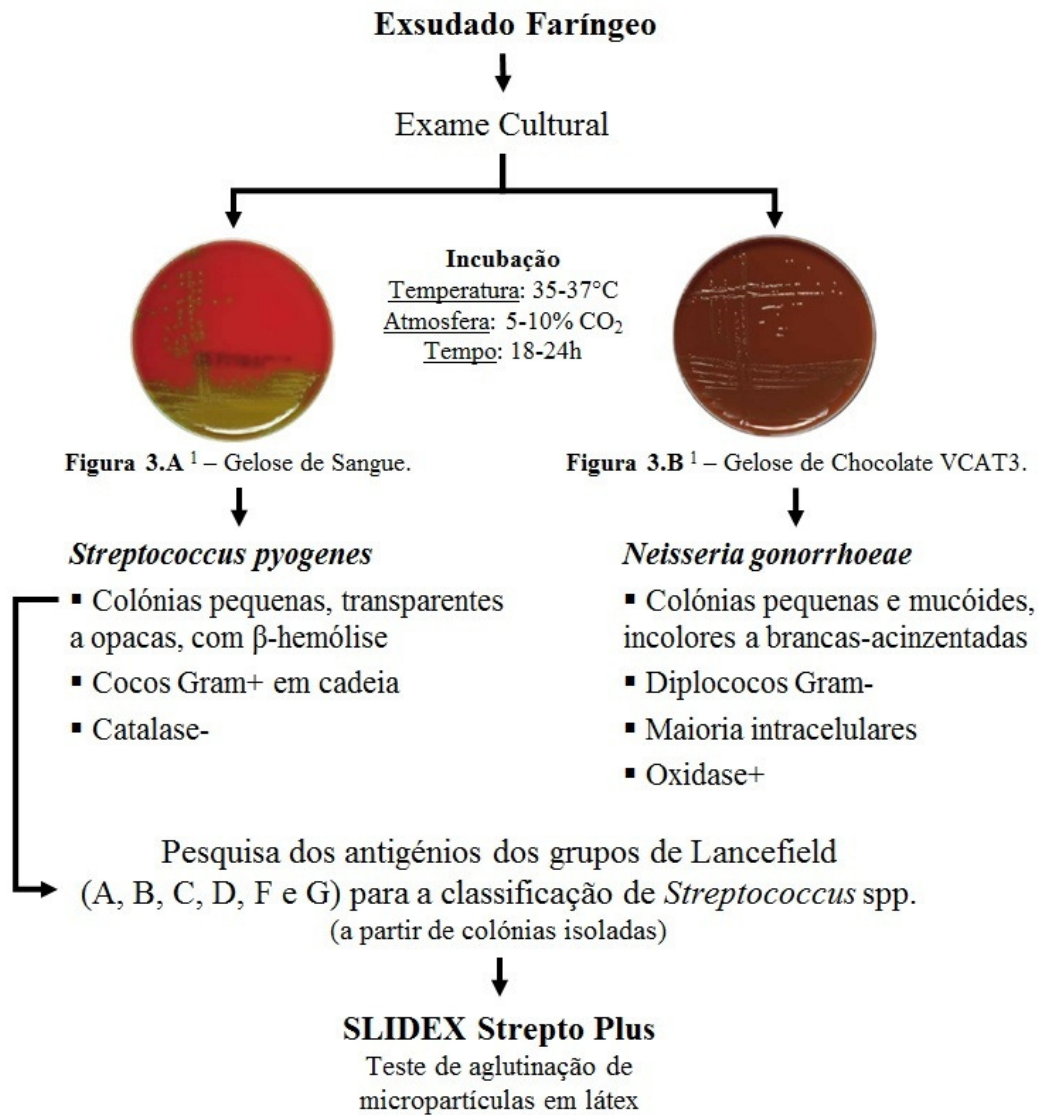
O agente mais comum da faringite viral é o vírus de Epstein-Barr, estando associada a um quadro clínico de Mononucleose Infecciosa.

3.1 Colheita

Na suspeita de uma faringite, o produto biológico colhido é um exsudado faríngeo. A colheita deve ser realizada sob luz directa. O paciente é instruído a inclinar a cabeça para trás e respirar fundo, e a sua língua é deprimida com uma espátula. Usando uma zaragatoa estéril, são esfregadas vigorosamente as amígdalas e a faringe posterior, zonas inflamadas com úlceras ou vesículas, ou os bordos de falsas membranas, evitando ao máximo contactar com as paredes laterais da cavidade oral, língua e úvula. A zaragatoa é colocada no respectivo tubo com ou sem meio de transporte, e transportada ao laboratório até 2h após a colheita, à temperatura ambiente.

3.2 Procedimento Laboratorial

Os principais microrganismos pesquisados são *Streptococcus pyogenes* e, quando há suspeita, *Neisseria gonorrhoeae* (Esquema 3.A).



Esquema 3.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com suspeita de faringite.

O método mais sensível para o diagnóstico de uma faringite por *Streptococcus pyogenes* é a cultura bacteriana em gelose de sangue. Existem, no entanto, testes rápidos de detecção do antígeno de *Streptococcus* do grupo A que utilizam directamente a zaragatoa e dispensam o exame cultural.

4. TRACTO RESPIRATÓRIO INFERIOR

Nesta região ocorrem infecções ao nível da traqueia (traqueíte), brônquios (bronquite), bronquíolos (bronquiolite) e alvéolos pulmonares (pneumonia). O tracto respiratório inferior é normalmente estéril.

A traqueíte e bronquite agudas manifestam-se através de tosse, febre, expectoração e falta de ar. Os agentes etiológicos mais frequentes são bacterianos e virais. Nas infecções crónicas predominam os agentes bacterianos, como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Infecções virais não requerem normalmente diagnóstico laboratorial, excepto se a sintomatologia exigir internamento hospitalar.

A pneumonia é a infecção mais grave do tracto respiratório inferior. Os sintomas da infecção aguda incluem febre, tosse, expectoração, dispneia e dores no peito. A maioria dos casos resulta da inalação de agentes patogénicos ou da aspiração de microrganismos da flora do tracto respiratório superior. Existem vários tipos de pneumonia (atípica, aguda comunitária, aguda nosocomial e crónica) que resultam da combinação entre factores microbianos e o estado das defesas do organismo. Os agentes etiológicos mais frequentes de pneumonia atípica são *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila*, sendo o vírus Influenza também comum. A pneumonia comunitária é geralmente causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, e ainda pelos vírus sincicial respiratório e parainfluenza (crianças) e citomegalovírus (adultos). A pneumonia nosocomial é geralmente causada por enterobacteriaceas, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* e *Legionella pneumophila*. A pneumonia por aspiração deve-se à aspiração maciça de conteúdo da orofaringe, incluindo uma mistura de bactérias aeróbicas (principalmente Gram-positivas) e anaeróbicas. Por fim, a infecção crónica é principalmente causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Infecções bacterianas latentes são também um factor de predisposição para o desenvolvimento de pneumonia crónica.

4.1 Colheita

Na suspeita de uma infecção do tracto respiratório inferior, os produtos biológicos colhidos são principalmente expectoração, secreções brônquicas e lavado broncoalveolar.

Uma boa amostra de expectoração deve ser a primeira expectoração da manhã, por ser bastante concentrada, e deve ser obtida num acesso de tosse profunda, após lavagem da boca apenas com água, de forma a minimizar a contaminação da amostra com flora da cavidade bucal. Caso não se verifique tosse profunda, esta pode ser provocada através da nebulização com soro fisiológico.

As secreções brônquicas podem ser colhidas por aspiração usando material apropriado e transportadas num recipiente estéril e seco. Em doentes com entubação traqueal a colheita é efectuada com o auxílio de uma sonda de colheita e uma seringa.

As amostras de expectoração e secreções brônquicas devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, em recipientes esterilizados e fechados. É necessária apenas uma amostra para exame bacteriológico enquanto que para pesquisa de micobactérias ou fungos são necessárias 3 amostras.

O lavado broncoalveolar é colhido por broncoscopia através da injeção de solução salina num broncoscópio inserido nas ramificações brônquicas periféricas. A solução salina é depois aspirada e deve ser enviada ao laboratório nas próprias seringas devidamente tapadas.

4.2 Procedimento Laboratorial

Nestas amostras, os principais microrganismos pesquisados são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Mycobacterium tuberculosis* (Esquemas 4.A, 4.B, 4.C e 4.D, e Tabela 4.A).



Figura 4.A² – Exame microscópico corado por Gram de amostras de expectoração:

1) Células epiteliais, 40x;

2) Leucócitos, 100x;

3) Fibras de mucina, 10x.

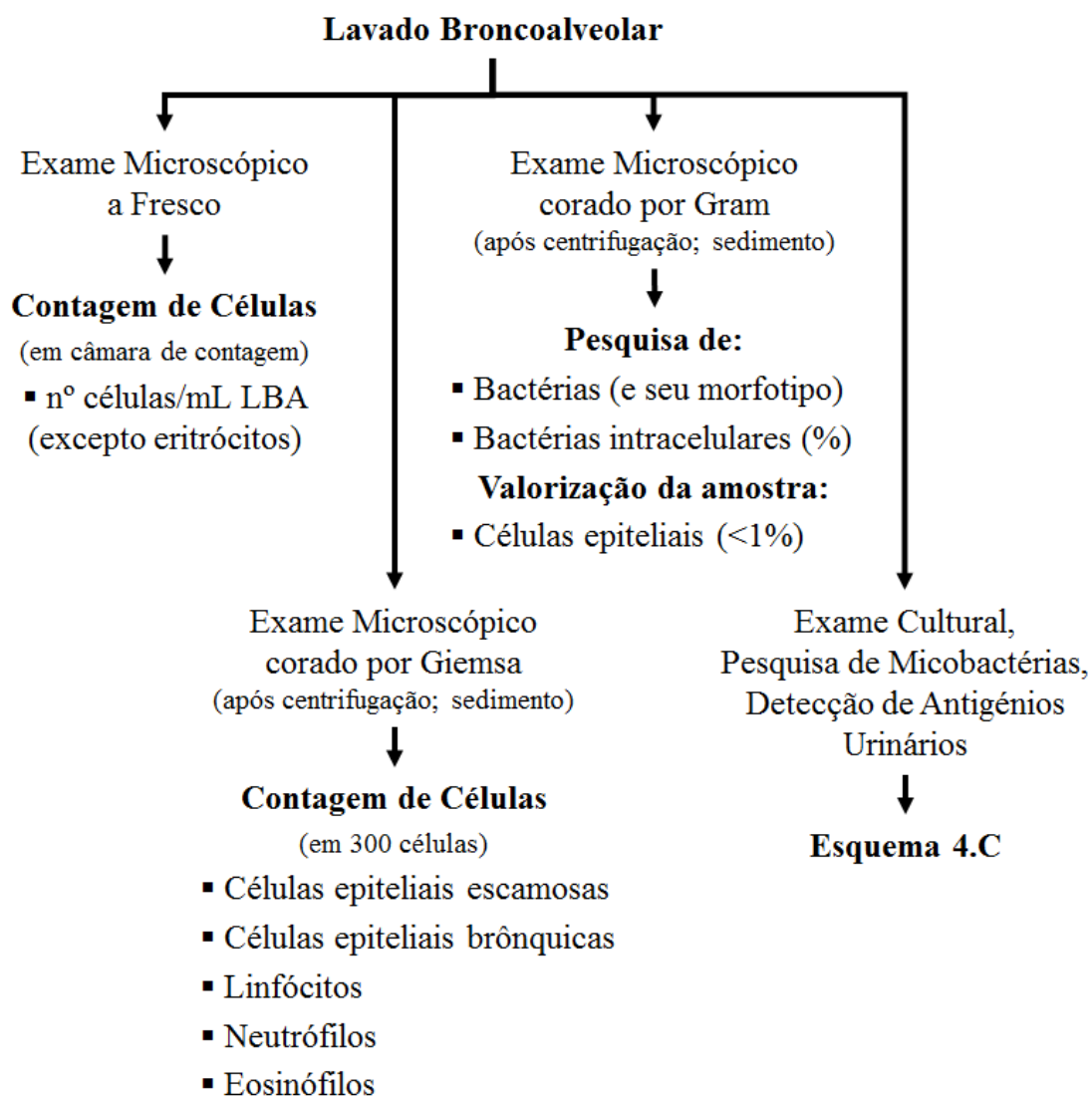
Esquema 4.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com sintomas respiratórios (exame microscópico de amostras de expectoração e secreções brônquicas).

Tabela 4.A – Critério de Murray e Washington para a valorização de amostras de expectoração, por observação a baixa ampliação (10x).

	Células Epiteliais	Leucócitos
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

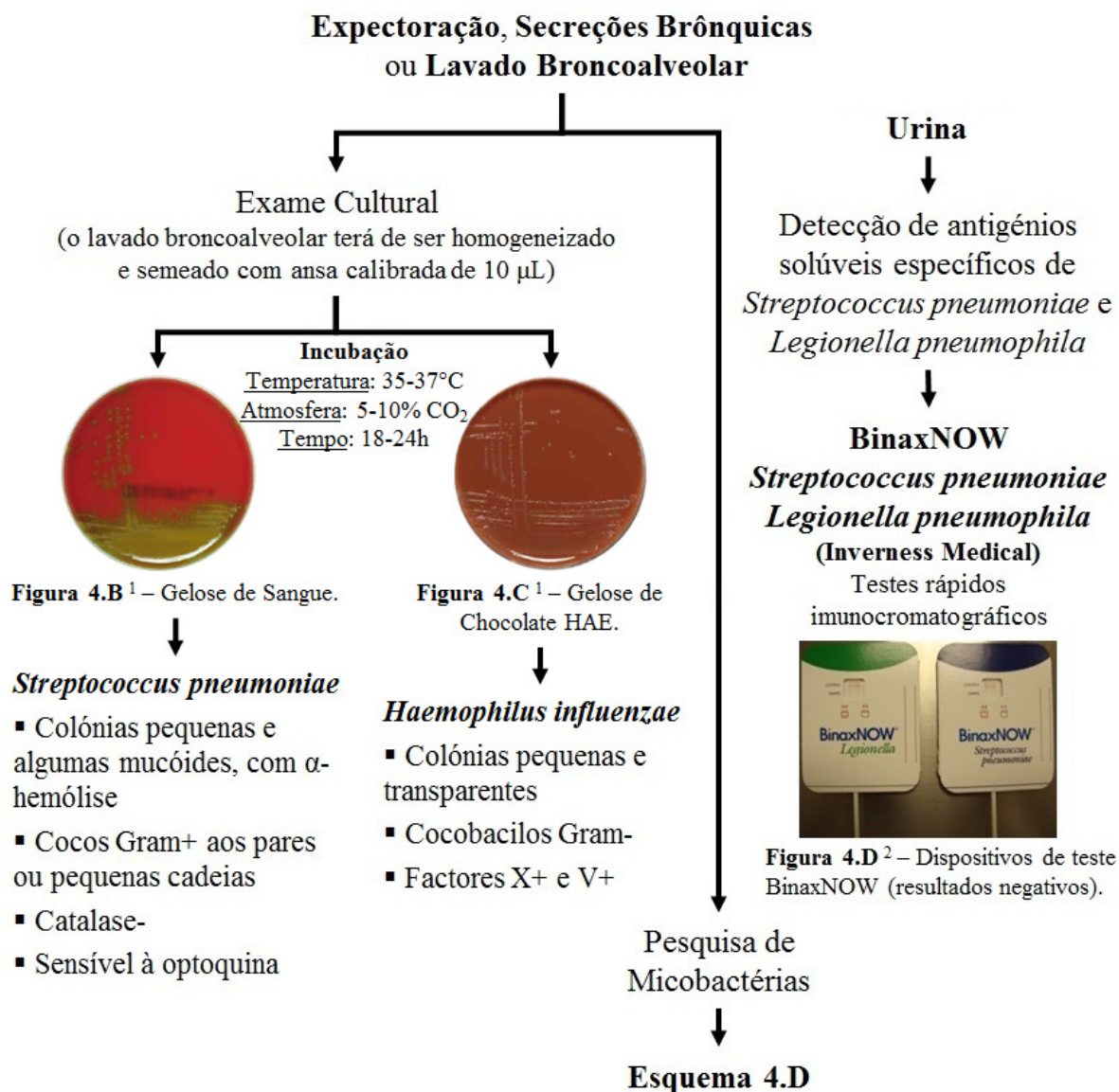
Grupos 1, 2 e 3 – amostras contaminadas por flora da orofaringe;

Grupos 4 e 5 – amostras com qualidade.



Esquema 4.B – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com sintomas respiratórios (exame microscópico de amostras de lavado broncoalveolar).

O lavado broncoalveolar representa uma amostragem de cerca de 10^6 alvéolos. A solução salina obtida corresponde a uma diluição de 100x do fluido de revestimento epitelial. Desta forma, uma contagem de 10^4 UFC/mL representa 10^6 UFC/mL deste fluido, sendo um valor já apropriado para diferenciar colonização de infecção. Neste produto biológico, a contaminação por flora da orofaringe é limitada.



Esquema 4.C – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com sintomas respiratórios (exame cultural de amostras de expectoração, secreções brônquicas e lavado broncoalveolar, e pesquisa de antígenos urinários).

Na suspeita de pneumonia aguda (devidamente fundamentada com historial clínico, auscultação com estetoscópio e radiografias do tórax), para além da cultura da expectoração ou de outros produtos, poderá ser aconselhável a colheita de hemoculturas.

4.3 Tuberculose

A tuberculose é uma patologia bastante complexa. Estima-se que cerca de 1/3 da população mundial está infectada com o seu agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis*, que causa a morte de cerca de 3 milhões de pessoas anualmente. Apesar de existir terapêutica eficaz contra a tuberculose, o vírus HIV veio novamente aumentar a incidência desta patologia pois permitiu um aumento da eficácia de transmissão. A terapêutica é longa e a não comparência leva ao aparecimento de resistências, o que já se tem verificado na comunidade, hospitais e prisões.

Trata-se de uma patologia que pode afectar vários tecidos do organismo mas, na maioria dos casos, afecta apenas a região pulmonar. Os sintomas incluem tosse crónica, perda de peso e febre, e a auscultação com estectoscópio assim como radiografias do peito são bastante úteis. Transmite-se através da via respiratória, por inalação de gotas de saliva contaminadas e requer uma exposição repetida. Afecta principalmente indivíduos que vivem em condições de aglomeração, ou cujas defesas se encontram debilitadas.

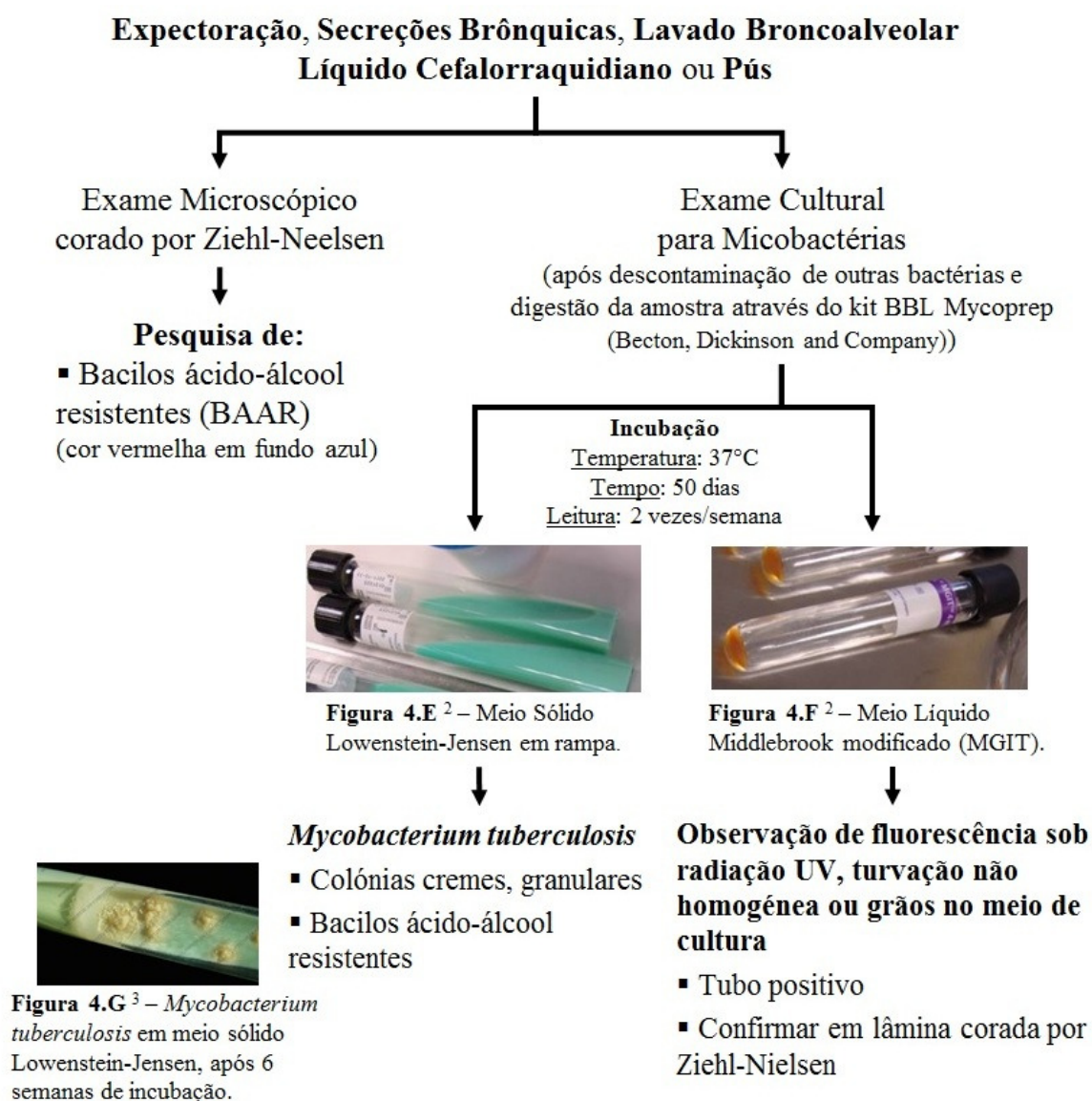
4.3.1 Colheita

As amostras utilizadas para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* incluem expectoração, secreções brônquicas, lavado brônquico, suco gástrico, urina, líquido cefaloraquidiano, outros líquidos (pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial, etc.), biópsias (gânglios linfáticos, pulmão, fígado, baço, osso, endométrio, intestino), sangue, medula e pús colhido com seringa. Não é efectuada esta pesquisa em amostras colocadas em formol ou outros conservantes, expectoração de 24h, urina de 24h, secreções colhidas por cateter protegido, amostras colhidas com zaragatoa, sangue coagulado, sangue menstrual ou fezes.

No caso da expectoração devem ser enviadas 3-5 amostras de dias sucessivos. Idealmente deverá ser a primeira expectoração da manhã colhida por tosse profunda, com um volume de 5-10 mL. Antes da colheita, lavar a boca e gargarejar só com água (não utilizar colutórios). Se for necessário, induzir a expectoração através de nebulização com soro fisiológico, inalando 20-30 ml de uma solução estéril de soro fisiológico. Amostras de suco gástrico devem ser colhidas em jejum, e idealmente 3-5 amostras de dias sucessivos. Amostras de urina devem ser obtidas por jacto médio, e idealmente 3 amostras de dias sucessivos.

4.3.2 Procedimento Laboratorial

Na suspeita de tuberculose, a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* é realizada com maior frequência em amostras de expectoração, secreções brônquicas e lavado broncoalveolar (Esquema 4.D).



Esquema 4.D – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com suspeita de tuberculose. O processo de digestão e descontaminação das amostras tem como objectivo maximizar a probabilidade de detecção de micobactérias, pois as amostras encontram-se normalmente contaminadas por flora normal de crescimento rápido.

5. TRACTO GASTROINTESTINAL

A flora associada ao intestino delgado inclui *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides* spp., *Escherichia coli* e outras enterobacteriáceas. No intestino grosso, a população bacteriana atinge valores de 10^{11} por mL de fezes e inclui *Escherichia coli* e outras enterobacteriáceas, *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. anaeróbicos e *Bifidobacterium* spp.

A designação Gastreenterite engloba vários tipos de infecções do tracto gastrointestinal. O sintoma mais comum destas infecções é a diarreia, isto é, produção de fezes líquidas ou em excesso. Designa-se por Desinteria a produção de diarreia com sangue associada à presença de microrganismos enteroinvasivos que penetram a mucosa intestinal provocando a sua inflamação. Outros síndromes diarreicos são normalmente auto-limitados e não associados a dor, e provocados por vírus, parasitas ou bactérias. Um síndrome especial causado principalmente por *Salmonella typhi* denominado por febre entérica caracteriza-se por febre, cefaleias e dores abdominais, esplenomegália, bradicardia, leucopénia e obstipação.

Os agentes etiológicos mais frequentemente associados às gastreenterites são *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica* e agentes virais, incluindo rotavírus e vírus de Norwalk.

O pedido de análise de fezes é normalmente realizado pelo clínico se o doente adquiriu um síndrome de imunodeficiência, viajou recentemente para um país subdesenvolvido, apresenta queixa de fezes com sangue, apresenta diarreia há mais de três dias e/ou a diarreia criou a necessidade de hidratação intravenosa, ou o doente apresenta febre de origem desconhecida.

5.1 Colheita

A colheita de fezes para pesquisa bacteriológica consiste em 3 amostras de dias diferentes (identificados) com 1-2 gramas, enviadas ao laboratório em recipiente estéril e seco ou com meio de transporte (meio Cary-Blair). É importante não encher os frascos e evitar contaminações com urina. Em recém-nascidos e em adultos debilitados, a colheita deve ser feita com o auxílio de uma zaragatoa rectal inserida até cerca de 2.5 cm acima do esfíncter anal, quando não é possível a colheita de fezes. O transporte ao laboratório deve ser efectuado até 1h (sem meio de transporte) ou 4h (com meio de transporte) após a colheita, à temperatura ambiente.

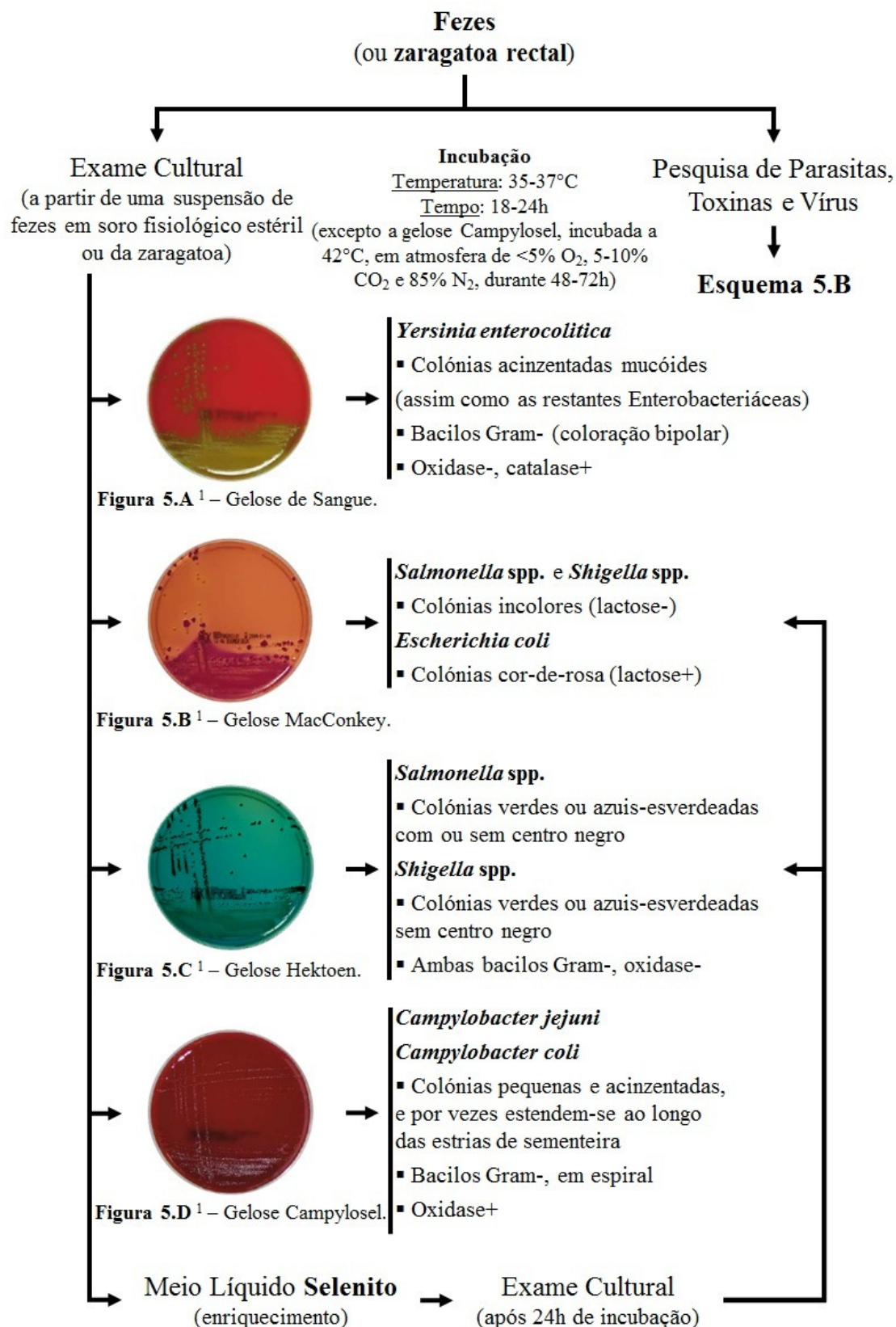
Para a pesquisa de toxinas A e B de *Clostridium difficile* só são aceites fezes líquidas, colhidas nas condições descritas anteriormente. O transporte ao laboratório deve ser efectuado até 1h após a colheita à temperatura ambiente.

A colheita para pesquisa parasitológica é semelhante, necessitando, no entanto, que o doente reduza o consumo de alimentos ricos em celulose e oleaginosas (até 72h antes do exame) e não use purgantes ou medicamentos ricos em carvão, bário, alumínio, magnésio, bismuto, caolino e óleo de parafina (até 3-5 dias antes do exame). O transporte ao laboratório deve ser efectuado o mais rápido possível, podendo as fezes ser conservadas a 4°C durante 24h.

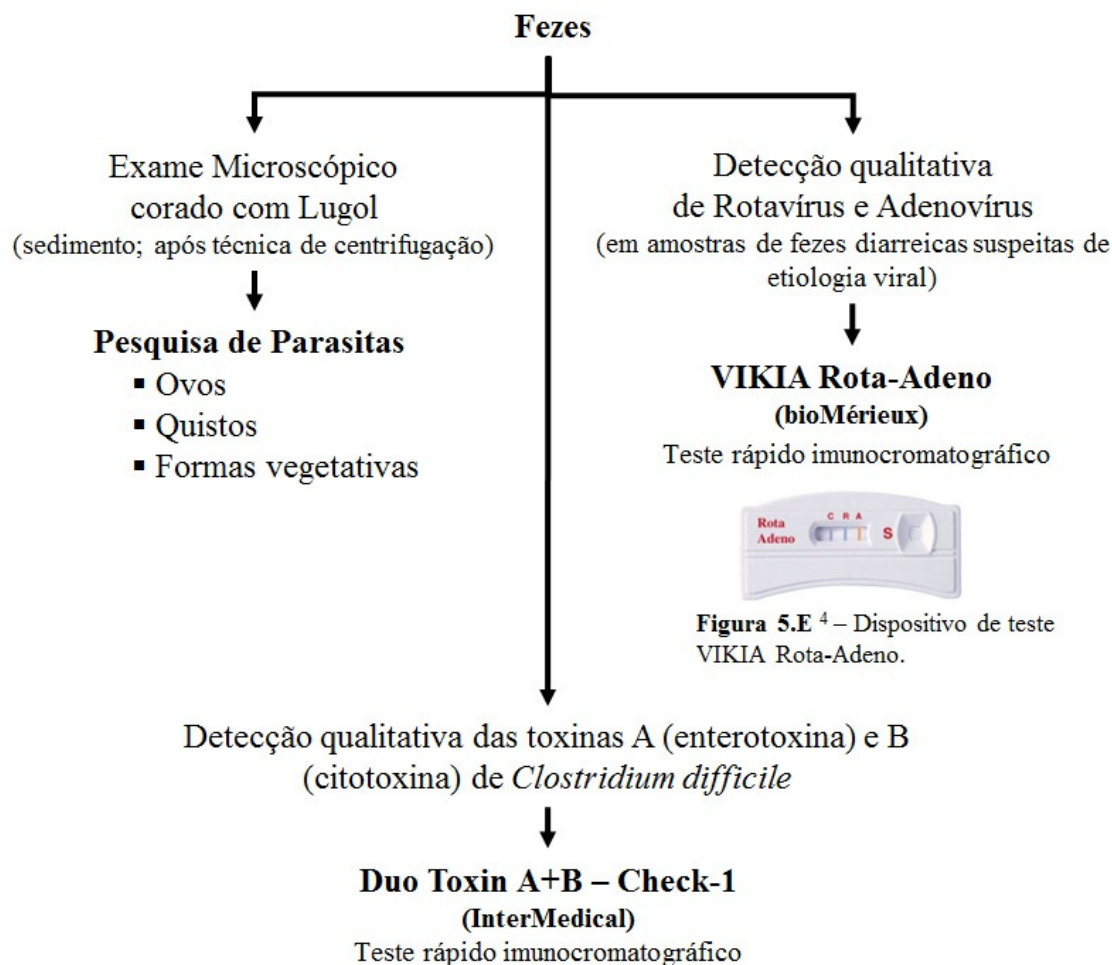
Para a pesquisa de antigénio de Rotavírus, a colheita deve ser efectuada durante a fase aguda da patologia (primeiros 3-5 dias), sendo as amostras colhidas para recipientes estéreis e secos, e transportadas ao laboratório o mais rápido possível. Em situações excepcionais, as amostras podem ser conservadas a 2-8°C durante 24h, mas dando conhecimento ao laboratório.

5.2 Procedimento Laboratorial

Nas amostras de fezes é efectuada a pesquisa de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica*, e a detecção qualitativa de *Clostridium difficile*, rotavírus e adenovírus. As amostras de fezes devem ser examinadas e semeadas o mais rápido possível após a colheita, pois conforme arrefecem verifica-se uma diminuição do seu pH, o que é suficiente para inibir o crescimento de algumas espécies patogénicas (Esquemas 5.A e 5.B).



Esquema 5.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com diarreia (exame cultural).



Esquema 5.B – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com diarreia (pesquisa de parasitas, vírus e *Clostridium difficile*). A pesquisa de *Clostridium difficile* é realizada em doentes hospitalizados sob antibioterapia de largo espectro, pois é um agente etiológico importante de infecções nosocomiais.

5.3 Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes

O cancro do cólon e/ou do recto, também denominado por cancro colón-rectal, é um dos tipos de cancro mais frequente (tal como o cancro da pele, pulmão, próstata e mama). Este tipo de cancro está associado à perda de sangue no intestino grosso, sendo metabolizado pela flora intestinal e eliminado nas fezes sob a forma de sangue oculto.

5.3.1 Colheita

A colheita de fezes para pesquisa de sangue oculto deve consistir em 3 amostras obtidas em dias alternados, com cerca de 1-2 gramas, colhidas para recipientes estéreis e secos e evitando a contaminação com urina. O transporte ao laboratório deve ser efectuado o mais rápido possível. A refrigeração a 4°C é possível mas reduz a fiabilidade dos resultados.

A técnica usada no laboratório não requer o cumprimento de uma dieta específica.

5.3.2 Procedimento Laboratorial

Para a pesquisa de sangue oculto nas fezes é usado o kit **One-Step FOB** (Chemtrue) que consiste num teste imunocromatográfico para a detecção qualitativa de hemoglobina do sangue humano em amostras de fezes.

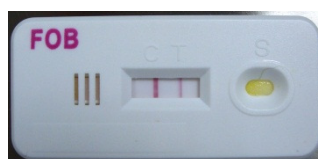


Figura 5.F² – Dispositivo de teste One-Step FOB (resultado positivo, teste validado).

6. TRACTO URINÁRIO

O tracto urinário subdivide-se em superior (rins, pélvis renal e ureteres) e inferior (bexiga e uretra).

As infecções do tracto urinário superior são geralmente ascendentes, tendo origem na bexiga e ascendendo através dos ureteres até aos rins. Numa situação normal, existem mecanismos que impedem o refluxo da urina da bexiga para os ureteres. Mas nos indivíduos que apresentam anomalias do tracto urinário, a bexiga aumentada por obstrução do fluxo, ou mesmo o peso do útero durante a gravidez, apresentam maior risco de refluxo. As complicações mais frequentes são as infecções da pélvis renal (pielite) e dos rins (pielonefrite), que podem ter carácter agudo ou crónico. Outra via de infecção no tracto urinário superior é a hematogénea, na qual os microrganismos alcançam os rins pela corrente sanguínea, originando abscessos multifocais ou pielonefrite supurativa. Os sintomas são geralmente febre, arrepios e dor na região lombar.

As infecções do tracto urinário inferior envolvem normalmente a bexiga e a uretra. Os sintomas são semelhantes independentemente do local e incluem frequência e urgência para urinar pequenas quantidades de urina, assim como dor e peso na zona supra-púbica.

É ainda de referir a bacteriúria assintomática, que geralmente só requer terapêutica em situações especiais, nomeadamente grávidas, mulheres que realizaram cirurgia genito-urinária invasiva, e transplantados de rim.

O agente etiológico mais frequente das infecções do tracto urinário é *Escherichia coli*. Outros microrganismos responsáveis por estas infecções são *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Staphylococcus* spp..

6.1 Colheita

A urina é um fluido biológico habitualmente estéril, mas a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que usualmente a colonizam, podendo conduzir a erros na interpretação da urocultura. Para o diagnóstico de infecção do tracto urinário são válidas várias amostras, nomeadamente jacto médio, punção de cateter urinário (algália), saco colector (bebés), punção supra-púbica, drenagem de nefrostomia e punção renal. Deve ser colhida a primeira urina da manhã. Se tal não for possível, efectuar a colheita após 2-3h sem urinar.

Em adultos, o procedimento de colheita de uma urina asséptica deve ser o seguinte:

- Lavar as mãos com água e sabão;
- Usando uma compressa esterilizada embebida em água ou soro fisiológico estéril e sabão neutro (nunca agentes antissépticos) lavar, na mulher, a vulva, da frente para trás, e, no homem, puxar o prepúcio e lavar a glande;
- Remover o sabão com uma compressa esterilizada embebida em água ou soro fisiológico estéril e em seguida secar com compressas esterilizadas;
- Com uma das mãos afastar, na mulher, os grandes lábios, e, no homem, o prepúcio, mantendo-os nessa posição durante todo o processo, e com a outra mão segurar no recipiente esterilizado próprio para a recolha da urina;
- Começar a urinar para a sanita, rejeitando as primeiras gotas, colher o jacto médio para o recipiente e desperdiçar a restante urina (não é necessário encher completamente o recipiente);
- Tapar o recipiente com cuidado para não tocar nos bordos ou no interior da tampa, certificando-se de que fica bem fechado de forma a não verter.

Quando necessária a colocação de um saco colector estéril em crianças:

- Lavar as mãos com água e sabão;
- Colocar o bebé sobre uma superfície plana e retirar a fralda;
- Lavar os genitais externos com água e sabão neutro;
- Lavar a vulva da frente para trás ou o pénis (puxar o prepúcio e lavar a glande) com uma compressa esterilizada embebida em soro fisiológico ou água estéril, e secar com compressas esterilizadas;
- Colar o saco colector em torno do meato urinário;

- Mudar o saco de 30 em 30 min caso o bebé não tenha urinado;
- Após o bebé ter urinado, retirar o saco e aspirar a urina para o tubo estéril com ácido bórico (obrigatoriamente a amostra deve ter, no mínimo, 3 mL). Se o volume for inferior a 3 mL, colocá-lo dentro de um recipiente estéril, com cuidado para não tocar nos bordos ou no interior da tampa, certificando-se de que fica bem fechado de forma a não verter.

Em indivíduos algaliados, a colheita de urina para exame microbiológico deve ser feita por aspiração no local referenciado do sistema para o efeito, ou por punção da algália. Não é aceitável uma colheita de urina realizada a partir do saco colector da algália. O procedimento é o seguinte:

- Clampar a algália durante 10-15 min, imediatamente abaixo da derivação;
- Desinfectar as mãos e colocar luvas esterilizadas;
- Desinfectar com álcool a 70° o local a puncionar, numa extensão de 5-10 cm e deixar secar;
- Puncionar (com um ângulo de 45°) a parte oposta ao lúmen do balão, utilizando um tubo esterilizado com ácido bórico adaptado a uma agulha subcutânea e aspirar a urina (nunca menos de 3 mL);
- Retirar a pinça de clampagem e desinfectar o local de punção com álcool a 70° após a colheita;
- Homogeneizar a urina invertendo o tubo várias vezes;
- Em caso de não estar disponível o tubo estéril de colheita de urina com ácido bórico, puncionar com seringa e agulha e transferir a urina para um recipiente esterilizado, em condições de assépsia, com cuidado para não tocar nos bordos ou no interior da tampa, mas certificando-se de que fica bem fechado de forma a não verter.

A amostra de urina deve ser enviada ao laboratório o mais rápido possível, uma vez que deverá ser processada até 2h após a sua colheita. Caso não seja possível, poderá ser conservada no frigorífico a 4°C durante um máximo de 24h.

Para a pesquisa de antigénios de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila* do serogrupo 1 na urina de doentes com suspeita clínica de pneumonia, ou ainda *Streptococcus agalactiae*, são válidas as amostras referidas para a execução de uroculturas, assim como os

procedimentos de colheita referidos. Não é, no entanto, necessária a primeira urina da manhã e a amostra deve ser colhida antes do início dos tratamentos.

Estas amostras devem ser enviadas ao laboratório logo que possível. Em casos excepcionais, incluindo amostras vindas do exterior, deverão ser conservadas a 2-8°C, durante um período máximo de 14 dias, ou congeladas a 10-20°C negativos.

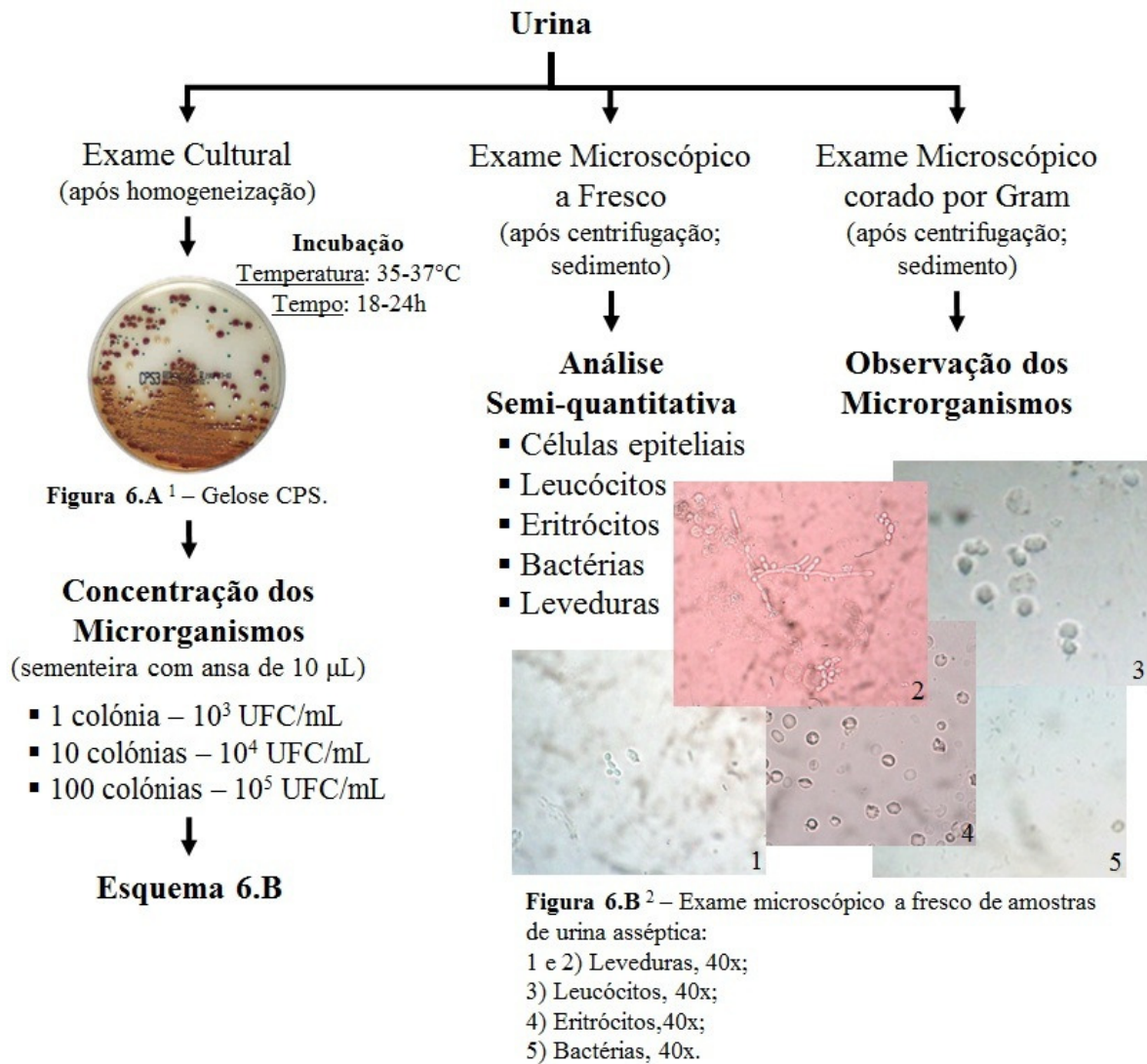
6.2 Procedimento Laboratorial

Independentemente de o meio de cultura apresentar um ou mais tipos de colónias, qualquer amostra que represente uma infecção do tracto urinário deve respeitar os seguintes critérios:

- Cultura pura (ou um tipo de colónias) com concentração (unidades formadoras de colónia/mL) $>10^5$ (em algumas situações valorizam-se concentrações de 10^4 - 10^5 UFC/mL);
- Raras células epiteliais (boa assépsia e boa colheita);
- Alguns ou muitos leucócitos (resposta inflamatória).

A interpretação das concentrações obtidas deve ter em conta outros parâmetros como a leucocitúria, sinais clínicos e epidemiologia.

Os microrganismos pesquisados nestas amostras são os agentes uropatogénicos comuns (Esquemas 6.A e 6.B).



Esquema 6.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com queixas de infecção urinária.



Figura 6.C² – Gelose CPS:

- Escherichia coli***
- Colónias cor-de-rosa a vermelho escuro
 - Bacilos Gram-
 - Indol+

Figura 6.D² – Exame microscópico corado por Gram: 1 e 2) Bacilos Gram- (*Escherichia coli*), leucócitos, 100x.

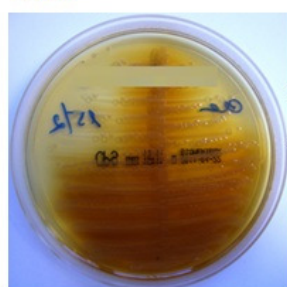
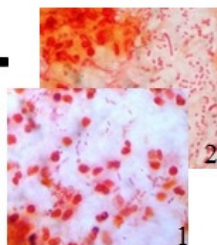


Figura 6.H² – Exame microscópico corado por Gram: Bacilos Gram- (*Proteus* spp.), leucócitos, 100x.

Figura 6.G² – Gelose CPS:

- Proteus* spp.**
- Colónias castanhas
 - Bacilos Gram-
 - *Proteus mirabilis*
 - Indol-

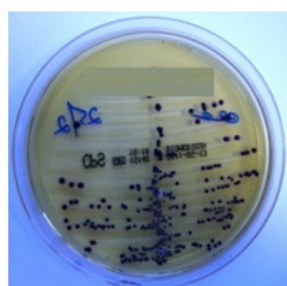
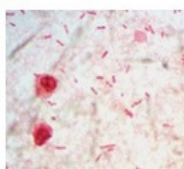


Figura 6.K² – Gelose CPS:

- Streptococcus* spp.**
- Colónias violeta
 - Cocos Gram+ em cadeia
 - Catalase-



Figura 6.O² – Exame microscópico corado por Gram: Cocobacilos Gram- em pares ou grupos (*Acinetobacter baumannii*), 100x.

Figura 6.N² – Gelose CPS:

- Acinetobacter baumannii***
- Colónias cremes
 - Cocobacilos Gram- em pares ou grupos
 - Oxidase-

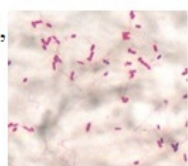


Figura 6.E² – Gelose CPS:

- Klebsiella* spp.**
- Colónias verdes mucóides

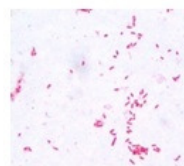


Figura 6.F² – Exame microscópico corado por Gram: Bacilos Gram- (*Klebsiella* spp.), 100x.

Figura 6.I² – Gelose CPS:

- Staphylococcus saprophyticus***
- Colónias cor-de-rosa opacas
 - Cocos Gram+ em cacho
 - Catalase+

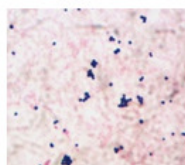


Figura 6.J² – Exame microscópico corado por Gram: Cocos Gram+ em cacho (*Staphylococcus saprophyticus*), 100x.

Figura 6.L² – Gelose CPS:

- Enterococcus* spp.**
- Colónias pequenas, azul turquesa
 - Cocos Gram+ em cadeia

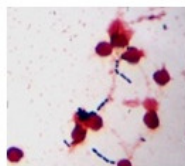


Figura 6.M² – Exame microscópico corado por Gram: Cocos Gram+ em cadeia (*Enterococcus* spp.), leucócitos, 100x.

Figura 6.P² – Gelose Candida:

- Candida albicans***
(re-isolamento em gelose Candida)
- Colónias azuis
 - Leveduras

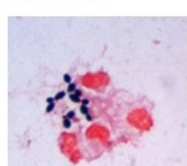


Figura 6.Q² – Exame microscópico corado por Gram: Leveduras (*Candida albicans*), leucócitos, 100x.



Esquema 6.B – Exemplos de microrganismos isolados em amostras de urina asséptica durante o estágio.

7. TRACTO GENITAL

O tracto genital é composto por genitália interna e externa. Na mulher, a genitália interna inclui ovários, trompas de falópio, útero (endométrio), colo do útero e vagina (e suas glândulas acessórias), enquanto que no homem inclui testículos, epidídimos, vesículas seminais e uretra. A genitália externa consiste, respectivamente, nos lábios e pénis.

A flora normal do tracto genital inclui vários microrganismos, dependendo da região. Na vagina e na uretra encontram-se enterobacteriáceas, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase-negativos, *Corynebacterium* spp. não patogénicos e microrganismos anaeróbios. Na vagina encontram-se ainda *Lactobacillus* spp.. Na genitália externa e na região perineal encontram-se *Corynebacterium* spp. não patogénicos, *Staphylococcus* coagulase-negativos, *Micrococcus* spp. e enterobacteriáceas. O colo do útero é normalmente estéril, podendo estar contaminado com flora vaginal em pequena quantidade. As restantes regiões do tracto genital encontram-se estéreis.

As infecções do tracto genital podem ser transmitidas por via sexual ou não. Os agentes mais comuns de infecções transmitidas por via sexual incluem *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Chlamydia trachomatis*.

A vaginite consiste numa inflamação da vagina, que pode afectar a vulva (vulvovaginite) e o colo do útero (cervicovaginite). Manifesta-se pelo aparecimento de leucorreia, associado a sensação de ardor, mal-estar ou dor. A intensidade das manifestações e as características do fluxo vaginal dependem do agente etiológico. *Neisseria gonorrhoeae* causa uma vaginite de evolução crónica sem manifestações evidentes na mulher adulta, mas adopta uma forma aguda com leucorreia amarelada abundante em crianças e adolescentes. *Trichomonas vaginalis* causa o aparecimento de leucorreia amarelada nauseabunda (tricomoníase). *Candida albicans* causa a formação de secreções espessas e coalhadas (candidíase). Estes microrganismos (assim como *Chlamydia trachomatis*) são também capazes de causar uretrite, isto é, inflamação da mucosa que reveste a uretra. Manifesta-se através de dor ao urinar e produção de secreções uretrais. Podem ocorrer casos assintomáticos (mais frequentes em mulheres).

A vaginose bacteriana é uma vaginite não específica caracterizada pelo aumento da produção de secreções, sem sinais clínicos de inflamação (sem leucócitos), na qual se observa uma mistura de bactérias na ausência de fungos e parasitas. Há uma diminuição da prevalência de *Lactobacillus* spp., com um aumento de *Gardnerella vaginalis* associada a microrganismos anaeróbios como *Mobiluncus* spp., *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp. e *Mycoplasma* spp..

Outro agente, maioritariamente transmitido por via sexual, é o vírus herpes simplex, capaz de causar lesões ulcerativas, quer na genitália externa, quer na genitália interna, após um período assintomático.

Streptococcus do grupo B e *Listeria monocytogenes* são dois dos agentes etiológicos de infecções transmitidas ao feto durante a gestação ou durante o nascimento, expondo a criança ao risco de sépsis e meningite neonatal.

7.1 Colheita

Na suspeita de uma infecção do tracto genital são colhidas amostras de exsudado vaginal, endocervical e uretral.

Para a colheita de um exsudado vaginal, o procedimento é o seguinte:

- Colocar um espéculo humedecido apenas com soro fisiológico;
- Rodar a zaragatoa na parte mais alta da mucosa vaginal e fundos de saco posteriores;
- Se não for possível enviar lâminas, devem ser sempre colhidas duas zaragatoas com meio de transporte.

A colheita de um exsudado endocervical para a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*, o procedimento é o seguinte:

- Colocar um espéculo humedecido apenas com soro fisiológico;
- Limpar o colo do útero usando uma compressa esterilizada;
- Introduzir a zaragatoa no endocolo (2-4 cm), rodar fazendo pressão e esperar um pouco até que a zaragatoa fique impregnada;
- Retirar a zaragatoa sem tocar nas paredes da vagina;
- Se não for possível enviar lâminas, devem ser sempre colhidas duas zaragatoas com meio de transporte.

Para a colheita de um exsudado uretral, o procedimento é o seguinte:

- A colheita deve ser efectuada pelo menos 2h após a última micção;
- Introduzir na uretra uma zaragatoa metálica fina e flexível ($\pm 2\text{cm}$), rodar e esperar um pouco até que a zaragatoa fique impregnada;
- Devem ser preparadas duas zaragatoas;
- As zaragatoas devem ser introduzidas num tubo com meio de transporte.

Para a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis* num exsudado endocervical ou num exsudado uretral, a colheita deverá ser realizada usando material próprio que é fornecido pelo laboratório.

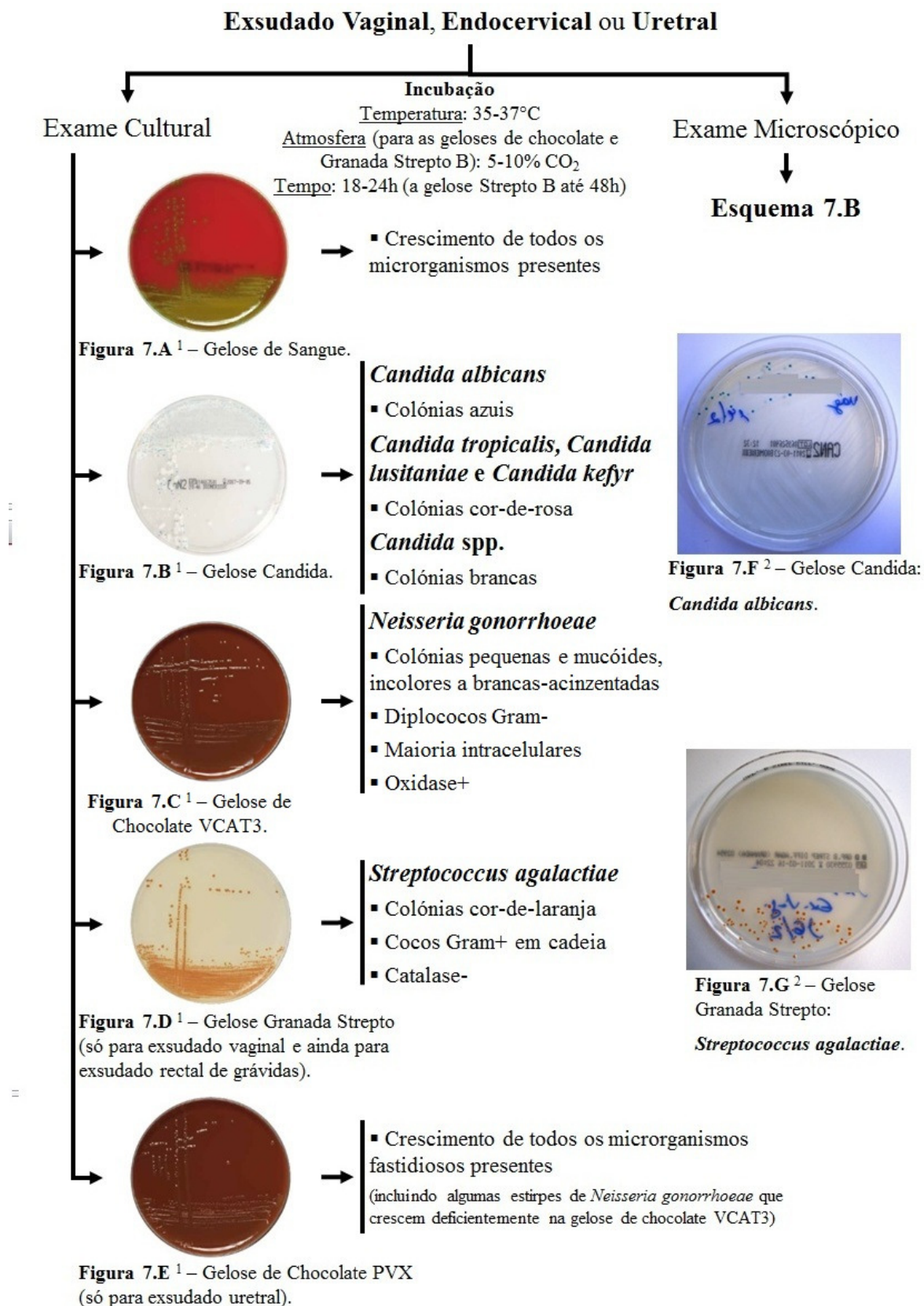
As amostras devem ser enviadas o mais rápido possível ao laboratório. Nunca refrigerar.

Algumas recomendações importantes para a obtenção de melhores resultados:

- Se o doente estiver sob o efeito de agentes antimicrobianos, aguardar quinze dias para a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e sete dias para a pesquisa de outros microrganismos;
- Evitar colheitas no período menstrual;
- Abster-se de relações sexuais nas 24h anteriores à colheita;
- Proceder à higiene diária habitual, mas sem uso de antissépticos;
- Não efectuar irrigações vaginais.

7.2 Procedimento Laboratorial

Em amostras de exsudado vaginal e uretral são pesquisadas as vaginites e uretrites (respectivamente) causadas por *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Candida* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*. Em amostras de exsudado vaginal são ainda pesquisadas as vaginoses bacterianas e, em grávidas, a colonização por *Streptococcus agalactiae* (este é também pesquisado na amostra de exsudado rectal correspondente). A pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* deve ser efectuada preferencialmente em amostras de exsudado endocervical (Esquemas 7.A e 7.B).



Esquema 7.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com queixas genitais (exame cultural).

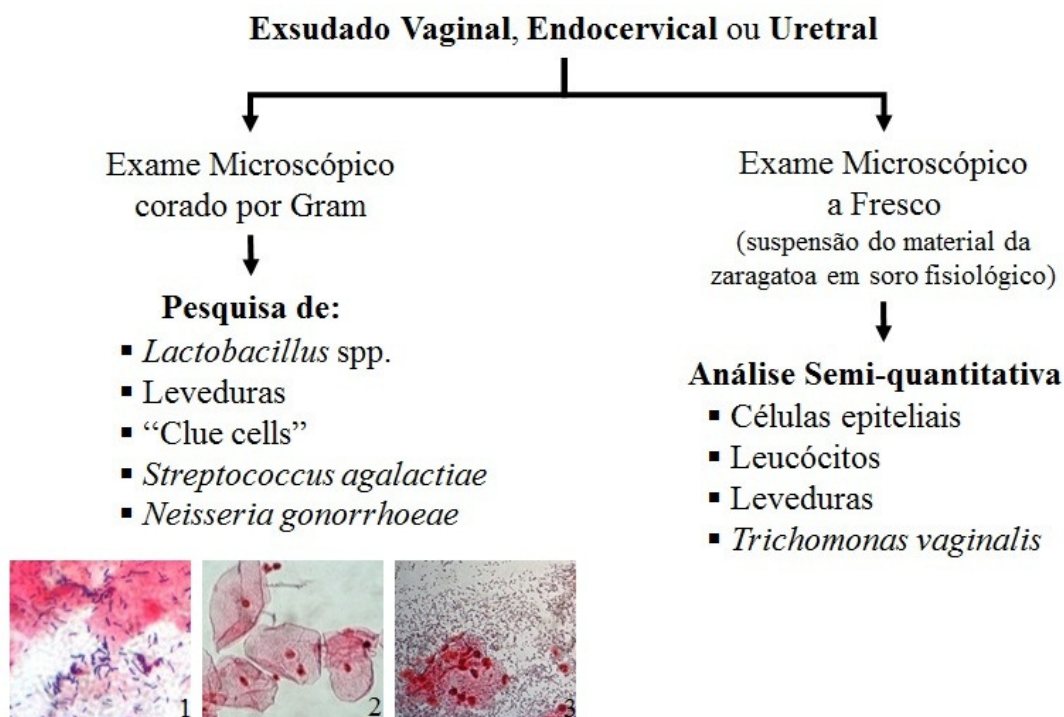


Figura 7.H² – Exame microscópico corado por Gram de amostras de exsudado vaginal:

- 1) *Lactobacillus* spp., 100x;
- 2) Células epiteliais, 40x;
- 3) Vaginose bacteriana, "clue cells", 40x.

Esquema 7.B – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com queixas genitais (exame microscópico).

Na mulher, fazem parte da flora normal espécies do género *Neisseria*, sendo, por isso, normal a observação de diplococos Gram-negativos. A suspeita de *Neisseria gonorrhoeae* surge quando é observada uma grande quantidade de leucócitos, e uma grande prevalência de diplococos Gram-negativos, na sua maioria intracelulares (aparecem também extracelulares devido à lise das células). No homem, o aparecimento de diplococos Gram-negativos no exsudado uretral constitui uma suspeita muito forte. Em ambos os casos, a identificação de *Neisseria gonorrhoeae* requer a observação de colónias típicas no exame cultural em gelose de chocolate VCAT3.

8. SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Do sistema nervoso central fazem parte o cérebro e a espinal medula, que são protegidos pelo crânio e pela coluna vertebral. Entre o osso e o tecido nervoso encontram-se as meninges (pia-máter, aracnóide e dura-máter). No espaço aracnóide, entre a pia-máter e a aracnóide, encontra-se o líquido cefalorraquidiano, ou líquido, que é um fluido translúcido estéril.

As infecções que ocorrem nestes órgãos são a encefalite (cérebro), mielite (espinal medula), encefalomielite e meningite (meninges).

A infecção mais frequente do sistema nervoso central é a meningite e os seus principais sintomas são a rigidez da nuca, cefaleias, febre e letargia. Em pacientes debilitados pode verificar-se uma alteração do seu estado mental, nomeadamente confusão, agitação, desorientação ou coma (Tabela 8.A).

Tabela 8.A – Características do líquido no estado fisiológico, e principais alterações encontradas nas meningites bacteriana, tuberculosa e viral.

	LCR Normal	Meningite Bacteriana *	Meningite Tuberculosa *	Meningite Viral *
Aspecto	Translúcido	Purulento	Turvo	Turvo
Proteínas mg/mL	14-45	Aumentadas	Diminuídas	Diminuídas
Glucose mg/mL	45-100 (60% da glicémia)	Diminuída	Diminuída	Normal
Células/mm ³	<5	Aumentadas	Aumentadas	Aumentadas
Tipos celulares	Mononucleadas	Neutrófilos	Linfócitos	Linfócitos
Bactérias (microscopia)	Ausentes	Presentes	Presentes/ Ausentes	Ausentes
Bactérias (cultura)	Ausentes	Presentes	Presentes	Ausentes

* A meningite bacteriana é denominada por séptica ou purulenta devido à predominância de neutrófilos, enquanto que as meningites micobacteriana, viral e fúngica são denominadas por assépticas.

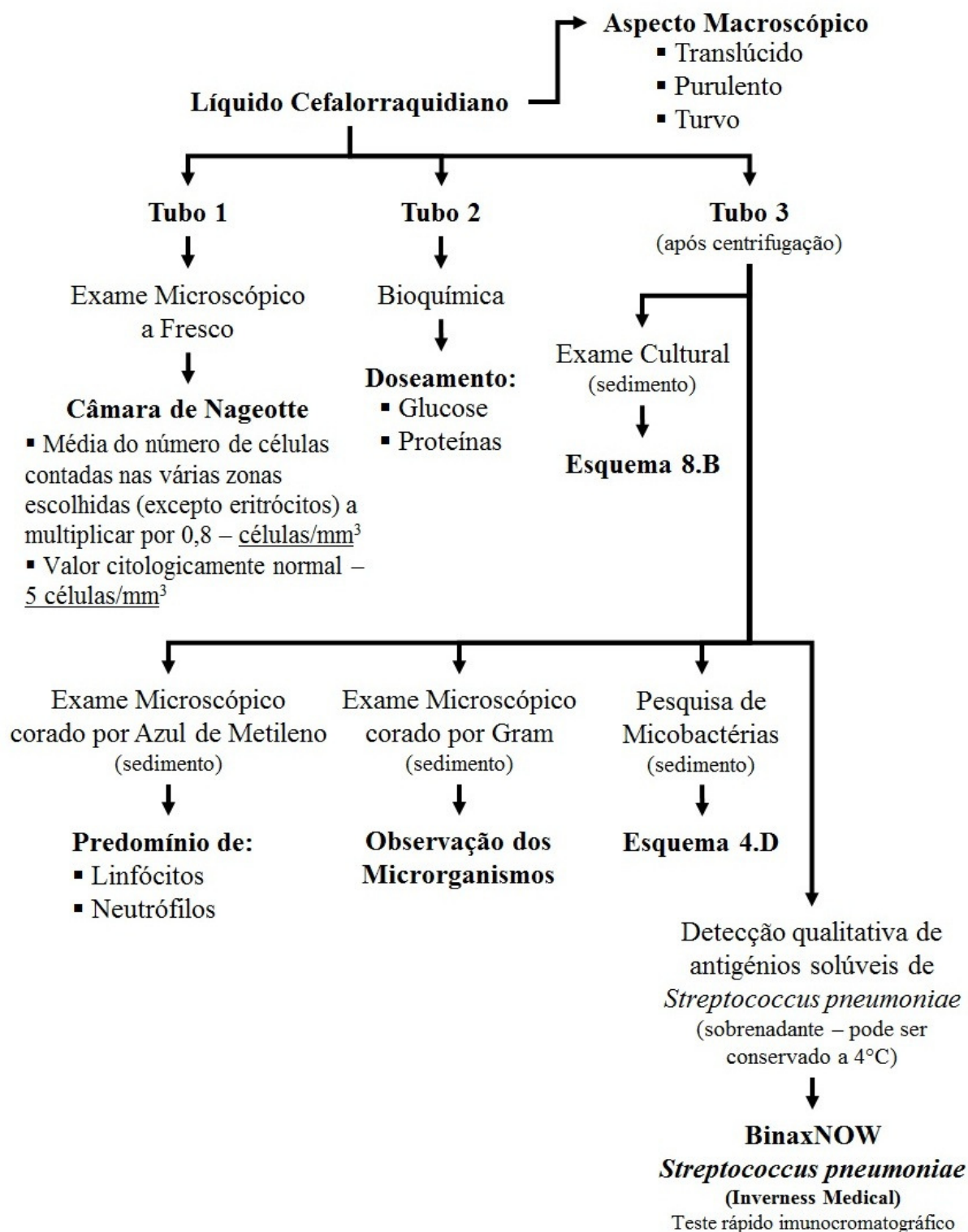
Os principais agentes etiológicos da meningite bacteriana neonatal são *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Em qualquer outro grupo etário, com predomínio na idade adulta, predominam *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*. A infecção por *Haemophilus influenzae* incide principalmente sobre crianças, mas foi praticamente erradicada através de vacinação.

8.1 Colheita

Na suspeita de meningite é efectuada a colheita de líquido cefalorraquidiano. É um acto médico realizado através de uma punção subdural, aspiração ventricular ou punção lombar (mais frequente). A punção lombar deve ser realizada sob condições de estrita assépsia, de forma a evitar a introdução de microrganismos no espaço medular assim como a contaminação da amostra com flora indígena do doente, o que comprometeria a identificação do verdadeiro agente etiológico ou poderia originar um resultado falso positivo no exame cultural. Previamente à colheita, é muito importante uma correcta desinfecção da pele com clorohexidina diluída a 0.5% em álcool a 70° ou outro desinfectante com propriedades semelhantes, deixando actuar o tempo necessário. O volume mínimo necessário corresponde a 5 mL, mas caso seja pedida a pesquisa de micobactérias ou fungos torna-se indispensável enviar o maior volume possível. A amostra deve ser colhida para 3 tubos secos e esterilizados, indicando a ordem de colheita. Os tubos devem ser enviados ao laboratório o mais rápido possível (5-10 min), à temperatura ambiente (nunca refrigerar, excepto se for pedida a pesquisa de vírus). Caso não seja possível enviar rapidamente, manter as amostras numa estufa a 37°C.

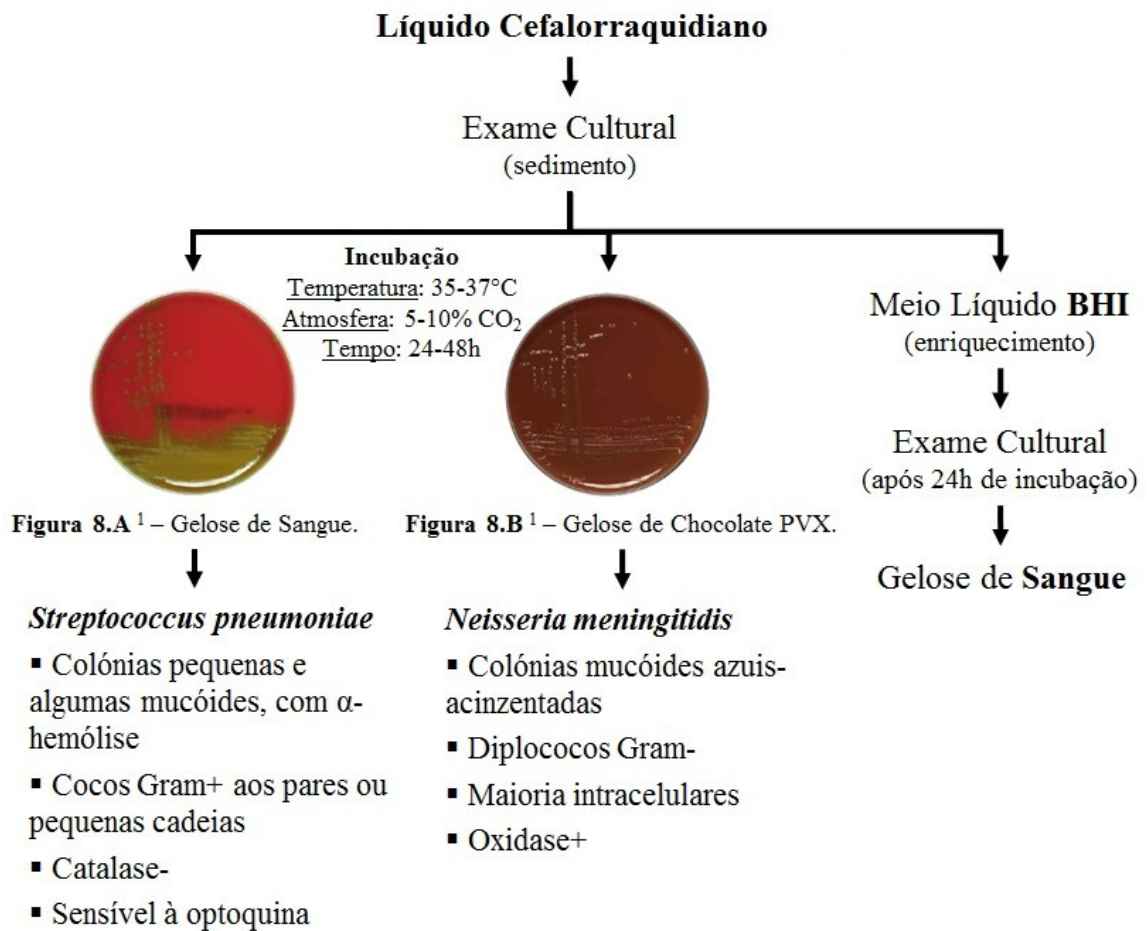
8.2 Procedimento Laboratorial

Nestas amostras, os principais microrganismos pesquisados são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Mycobacterium tuberculosis* (Esquemas 8.A, 8.B e 4.D).



Esquema 8.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com queixas de meningite (observação macroscópica e microscópica, e pesquisa de antígenos).

A presença de eritrócitos deve-se a uma de duas causas: a colheita foi traumática, com perfuração de vasos e contaminação do liquor com sangue, ou há hemorragia meníngea, derivada de uma patologia. É possível distinguir estas causas observando o aspecto do sobrenadante após centrifugação. Assim, se existe xantorráquia, isto é, o sobrenadante é amarelo e o sedimento é vermelho, significa que há hemorragia meníngea, pois os eritrócitos encontram-se no líquido há mais tempo havendo já a sua degradação fisiológica com libertação de bilirrubina. Se, pelo contrário, o sobrenadante é transparente, significa que foi apenas a colheita a ser traumática.



Esquema 8.B – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com queixas de meningite (exame cultural).

9. FERIDAS E ABCESSOS

As infecções dos tecidos epiteliais, conjuntivos e musculares são causadas por vários microrganismos em diferentes situações. A principal causa é a lesão da pele, que constitui uma defesa física muito importante quando intacta.

As feridas externas incluem escaras, mordeduras, queimaduras ou objectos estranhos na pele ou membranas mucosas. Procedimentos cirúrgicos constituem um factor de risco em hospitais, favorecendo infecções por microrganismos como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina ou *Streptococcus pyogenes*. Feridas internas ou abcessos podem estar associadas a apendicite, colecistite, celulite, infecções dentárias, osteomielite, sinusite, entre outros, e muitas vezes são polimicrobianos, o que dificulta a valorização dos microrganismos recuperados em cultura. A formação de pús é um indicador de sépsis local, podendo acumular-se no interior de um abcesso ou exsudar numa superfície mucocutânea. Sintomas associados são os típicos de uma situação inflamatória, isto é, rubor, dor, calor e inchaço.

9.1 Colheita

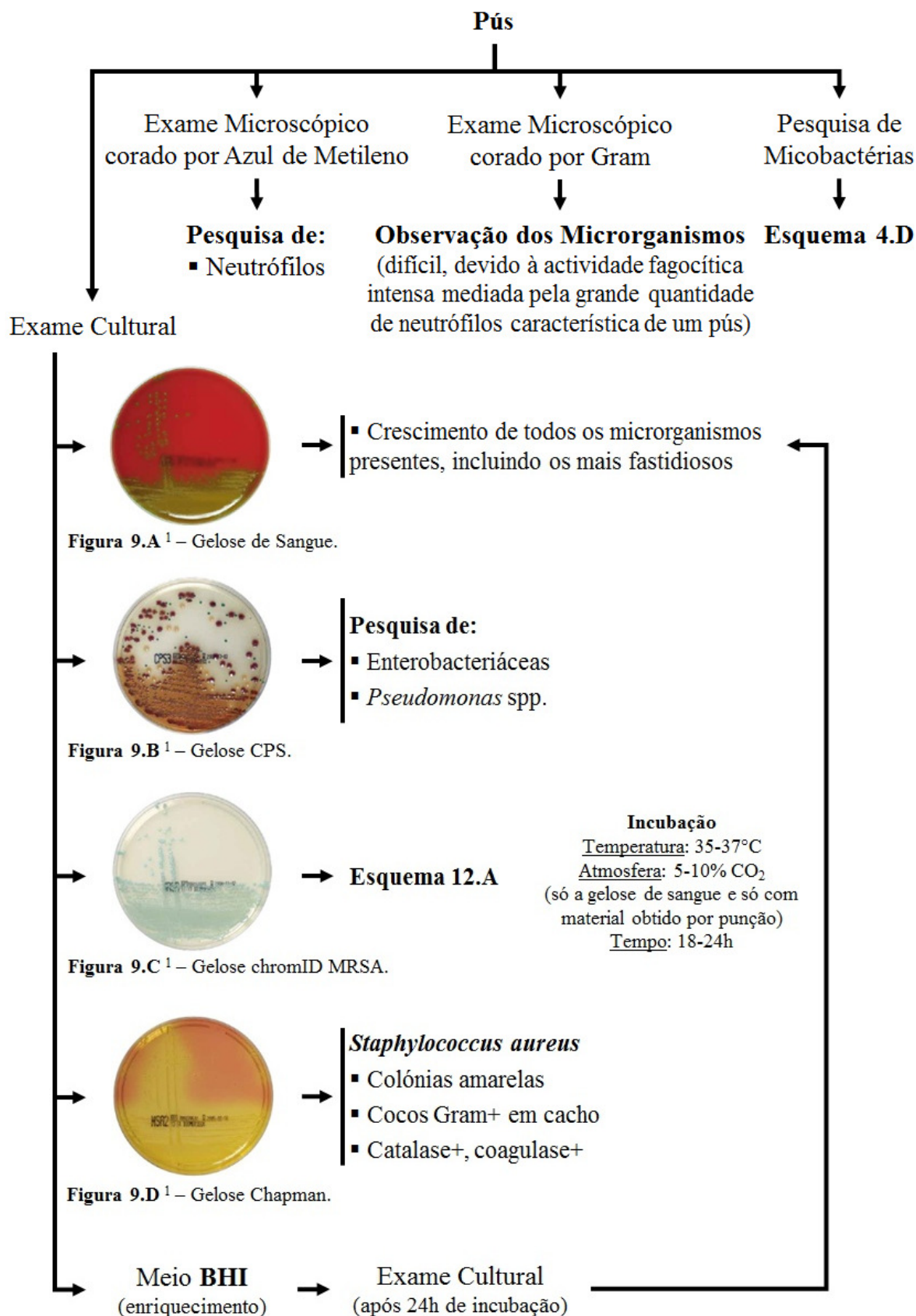
Numa ferida, a colheita de pús deve ser realizada após a lavagem da margem da ferida com água e sabão, e posterior desinfecção com álcool a 70°. O material purulento deve ser aspirado da profundidade da ferida com seringa e agulha. Caso não seja possível a colheita com seringa e agulha, devem ser colhidas duas zaragatoas com meio de transporte o mais profundamente possível, afastando os bordos da ferida.

Num abcesso, a colheita deve ser realizada após lavagem da pele com água e sabão, e posterior desinfecção com álcool a 70°. O material purulento deve ser obtido por punção e aspirado com seringa e agulha. A seringa deverá ser enviada devidamente tapada, mas sempre sem agulha.

As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível.

9.2 Procedimento Laboratorial

Enterobacteriáceas, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Candida* spp. são exemplos de microrganismos encontrados nestas situações (Esquemas 9.A, 4.D e 12.A).



Esquema 9.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com feridas ou abscessos. O produto obtido com zaragatoa tem menos qualidade do que o produto colhido através de punção, pois está mais sujeito a contaminação e é de difícil observação.

10. OLHO

As infecções externas do olho ocorrem normalmente nas estruturas superficiais (conjuntiva e córnea), enquanto que as infecções internas requerem uma lesão que permita a penetração dos microrganismos no globo ocular.

A conjuntivite é a infecção mais frequente do olho, e é muito contagiosa. Consiste na infecção da conjuntiva, uma membrana fina que reveste a pálpebra. É caracterizada por rubor, prurido, dor e produção de um exsudado mucoso ou purulento. Nas infecções de origem bacteriana, este líquido é bastante pegajoso e com tendência a solidificar, fazendo com que as pálpebras fiquem coladas. Os agentes etiológicos mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A conjuntivite aguda pode resultar ainda de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, quer em indivíduos sexualmente activos, quer em recém-nascidos. A conjuntivite viral tem como principais agentes os adenovírus.

A queratite é uma infecção bastante mais grave na córnea que pode provocar cegueira. O agente etiológico mais comum é *Staphylococcus aureus*. Alguns fungos podem também provocar infecção da córnea, provocando sintomas semelhantes aos da infecção bacteriana, baralhando o diagnóstico e atrasando a terapêutica. Esta infecção pode ainda ser provocada por herpesvírus.

As infecções mais graves são as que afectam o interior do olho. Podem ser endógenas, resultantes do transporte dos microrganismos através da corrente sanguínea, ou exógenas, resultantes de traumas físicos no olho (um exemplo é a infecção pós-cirúrgica).

10.1 Colheita

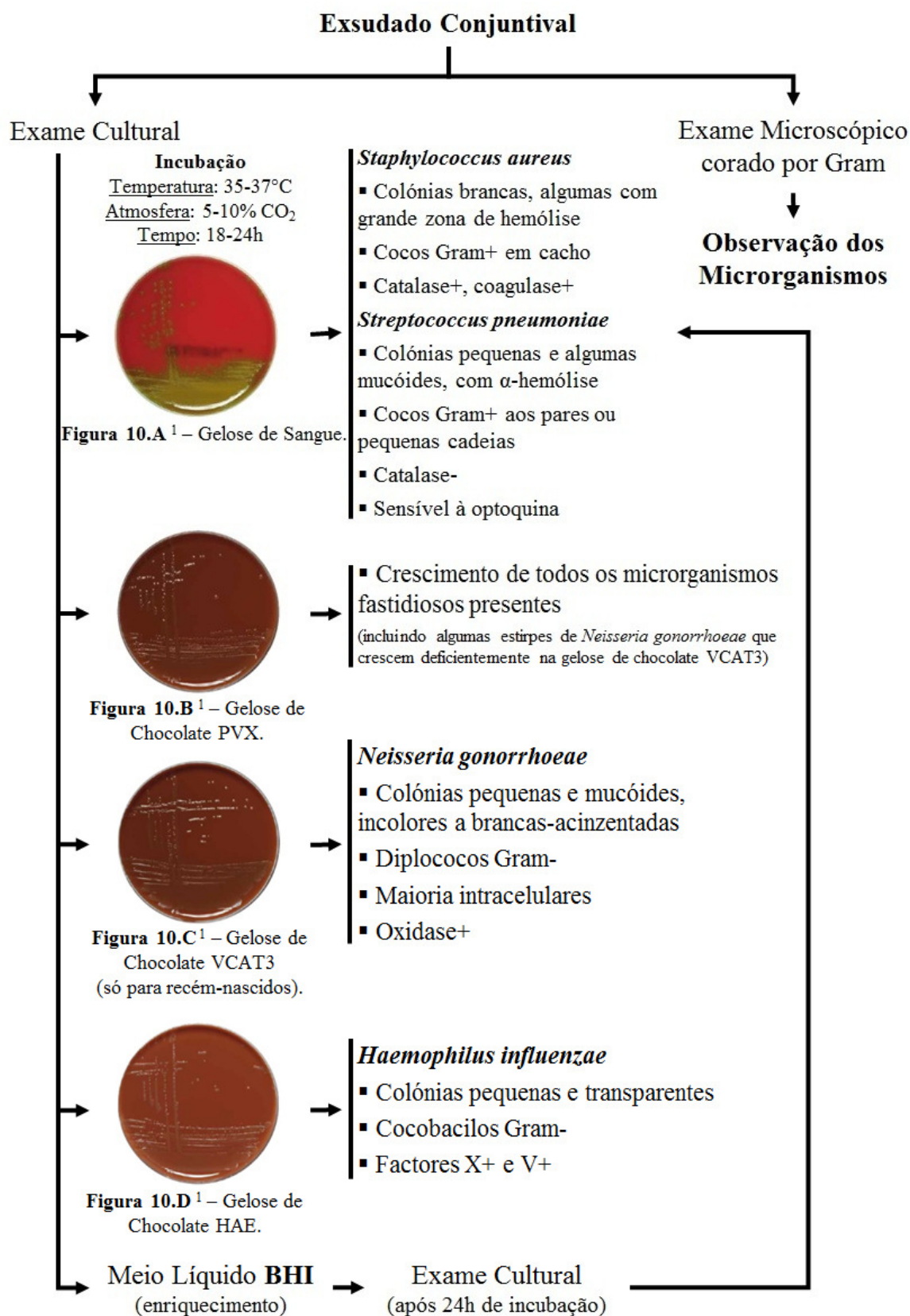
No diagnóstico das infecções oculares, o produto biológico colhido é o exsudado conjuntival. O procedimento é o seguinte:

- Limpar a pele à volta do globo ocular com soro fisiológico, utilizando uma compressa esterilizada;
- Deve ser colhido uma zaragatoa para cada olho, mesmo que só um apresente sinais de inflamação;
- Colher com a zaragatoa no fundo do saco conjuntival e fórnix de cada olho, tendo a atenção de identificar cada zaragatoa;
- Evitar contaminações com o bordo palpebral e pestanas;
- Enviar as zaragatoas em tubo seco estéril ou em meio de transporte (caso o transporte seja demorado) ao laboratório o mais rápido possível.

Para a pesquisa de *Chlamydia* spp. a colheita consiste na raspagem da conjuntiva ou da córnea, e é efectuada por um oftalmologista.

10.2 Procedimento Laboratorial

Nestas amostras é efectuada a pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus influenzae* (Esquema 10.A).



Esquema 10.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com suspeita de infecção ocular.

11. SANGUE

Bacterémia, fungémia e virémia consistem na presença de bactérias, fungos e vírus, respectivamente, no sistema circulatório, podendo ser assintomáticas ou sintomáticas.

A bacterémia pode ser transitória se as bactérias são rapidamente eliminadas pelas defesas do organismo, intermitente se as bactérias se encontram num reservatório no interior do organismo e são libertadas periodicamente para a corrente sanguínea, ou contínua se a infecção é intravascular. Pode ainda ser classificada como comunitária ou nosocomial. Os microrganismos encontrados e o prognóstico da infecção resultante variam consoante estes factores, e consoante a idade e o estado do sistema imunitário dos indivíduos afectados.

A infecção intravascular mais frequente é a endocardite, que consiste na infecção do revestimento endotelial do coração. Indivíduos que sofrem de alterações do coração e que realizaram procedimentos dentários apresentam maior risco de contrair esta infecção. A maioria dos agentes etiológicos são bactérias Gram-positivas, incluindo *Streptococcus viridans* e *Staphylococcus aureus*.

Septicémia consiste numa síndrome inflamatória sistémica associada a infecção. É caracterizada por febre, arrepios, taquicardia, hiperventilação e debilidade extrema, sintomas provocados pela toxicidade das toxinas bacterianas e/ou pelas citocinas produzidas pelas células inflamatórias. Em situações muito graves, a septicémia conduz à falha de múltiplos órgãos, provocando a morte do paciente. Os principais agentes etiológicos são bactérias Gram-negativas que produzem endotoxinas, mas há também bactérias Gram-positivas capazes de provocar este síndrome. Requer uma terapêutica agressiva e muitas vezes são utilizadas terapêuticas conjuntas.

Os cateteres vasculares aumentam o risco de infecção da corrente sanguínea, pois permitem a entrada de bactérias que colonizam a pele adjacente, podendo ainda actuar como um objecto estranho contaminado. Assim, os principais microrganismos encontrados nestas situações são *Staphylococcus* coagulase-negativos, bactérias da flora normal da pele. No entanto, as infecções mais graves são provocadas normalmente por *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativos.

11.1 Colheita

Para a colheita de amostras de sangue para hemocultura, o procedimento é o seguinte:

- As colheitas devem ser realizadas antes de iniciar a antibioterapia. Se esta já estiver em curso, efectuar a colheita antes da toma seguinte;
- Após a palpação da veia, desinfetar a pele com clorohexidina diluída a 0.5% em álcool a 70°, do centro para a periferia. Deixar a pele secar por completo;
- Desinfetar as mãos, calçar luvas esterilizadas e só depois efectuar a venipunção;
- Colher três hemoculturas em meio de BACTEC Plus Aerobic, espaçadas de 30 min de intervalo, e a partir de locais de venipunção diferentes (por forma a despistar contaminações);
- Desinfetar a tampa de borracha do frasco da hemocultura com álcool a 70° e deixar secar durante 1 min;
- Introduzir 8-10 mL de sangue em cada garrafa de hemocultura sem mudar de agulha e misturar por inversão. Não ultrapassar os 10 mL pois o excesso de volume leva a resultados falsos positivos. O volume ideal corresponde a 40 mL em adultos, por episódio de suspeita de bacterémia. Para crianças introduzir 5-10 mL de sangue, e se o volume for inferior a 3 mL, usar garrafas de hemocultura pediátricas (BACTEC Ped Plus);
- Identificar o frasco convenientemente, incluindo a data e a hora da colheita.

No caso de amostras de recém-nascidos, o procedimento é semelhante ao descrito. No entanto deverão ser colhidas apenas duas hemoculturas, espaçadas de 30 min de intervalo, e o volume a introduzir nas garrafas de hemocultura pediátricas (BACTEC Ped Plus) deverá ser 1-3 mL.

As colheitas não devem ser efectuadas através de cateter vascular, e não se deve esperar pelos picos febris.

As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível.

Para a colheita de uma ponta de cateter vascular, o procedimento é o seguinte:

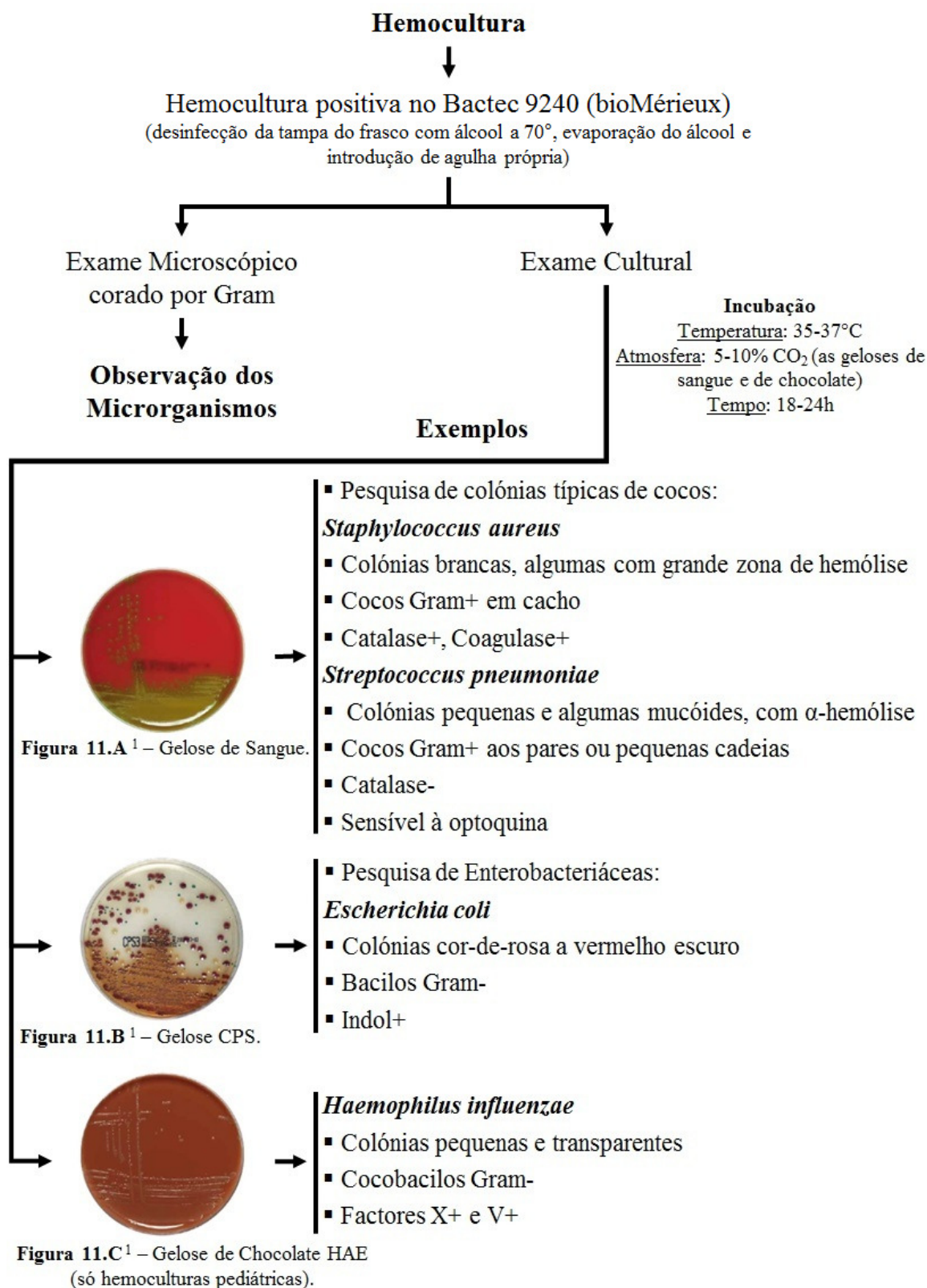
- Antes de retirar o cateter, colher três hemoculturas periféricas de locais de venipunção diferentes;
- Caso exista exsudado purulento no local de inserção do cateter vascular, colher com zaragatoa estéril com meio de transporte (neste produto não realiza a pesquisa de microrganismos anaeróbios);
- Retirar o cateter em condições de assépsia, após desinfecção da pele circundante com clorohexidina diluída a 0.5% em álcool a 70°;
- Cortar com uma lâmina de bisturi estéril o segmento distal (5 cm) do cateter e introduzir em tubo seco estéril.

O transporte ao laboratório das hemoculturas, da zaragatoa e da ponta de cateter vascular deve ser realizado o mais rápido possível.

11.2 Procedimento Laboratorial

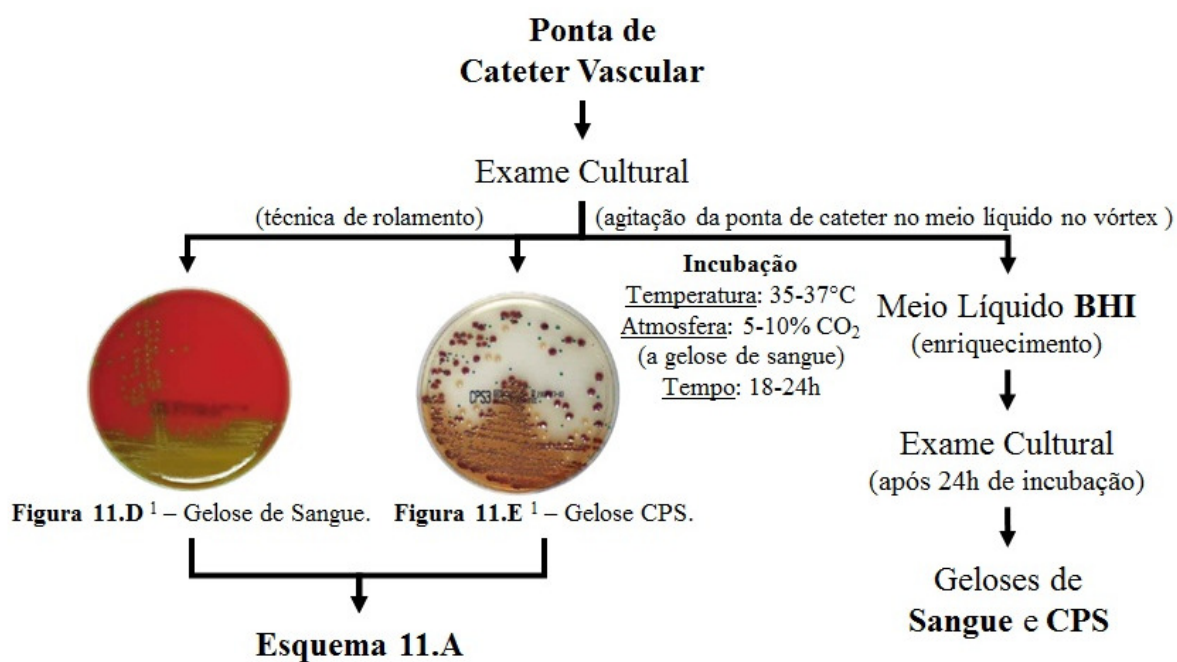
Na análise de uma hemocultura, o primeiro passo é o exame microscópico corado por Gram. É de todo o interesse conhecer alguma infecção simultânea à bacteremia, pois esta poderá ser secundária, facilitando a identificação e a caracterização do microrganismo subjacente, inclusive permitindo a escolha de meios de cultura mais específicos. São exemplos a cistite e pielonefrite provocadas por *Escherichia coli* e meningite provocada por *Neisseria meningitidis*.

Alguns exemplos de microrganismos encontrados frequentemente em hemoculturas incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, entre outros. Nas crianças com menos de 5 anos poderá ser útil a pesquisa de *Haemophilus influenzae*, uma vez que este microrganismo é capaz de causar bacteremia nesta população (Esquemas 11.A e 11.B).



Esquema 11.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial em pacientes com suspeita de infecção da corrente sanguínea e exemplos de alguns microrganismos.

Após a sementeira, os frascos de hemocultura são colocados na estufa a 35-37°C.



Esquema 11.B – Procedimento de diagnóstico laboratorial a partir de ponta de cateter vascular, em pacientes com suspeita de infecção da corrente sanguínea.

Se, após 24h de incubação, o meio líquido for negativo, incubar durante mais 24h nas mesmas condições.

12. PESQUISA DE MICRORGANISMOS MULTI-RESISTENTES

12.1 MRSA

Staphylococcus aureus resistente à meticilina, MRSA, é responsável por infecções graves e de difícil tratamento. É um microrganismo oportunista e o principal agente etiológico de várias infecções comunitárias e nosocomiais. Apresenta resistência a vários grupos de antibióticos, incluindo os β -lactâmicos, que englobam, entre outros, o grupo das penicilinas e das cefalosporinas.

12.1.1 Colheita

O principal local de contaminação é o nariz, sendo por isso, em caso de suspeita, efectuada a colheita de um exsudado nasal. Após humedecer uma zaragatoa com soro fisiológico estéril, esta é introduzida em ambas as narinas até cerca de 2.5 cm do orifício externo e rodada várias vezes, tocando no septo nasal e nas paredes.

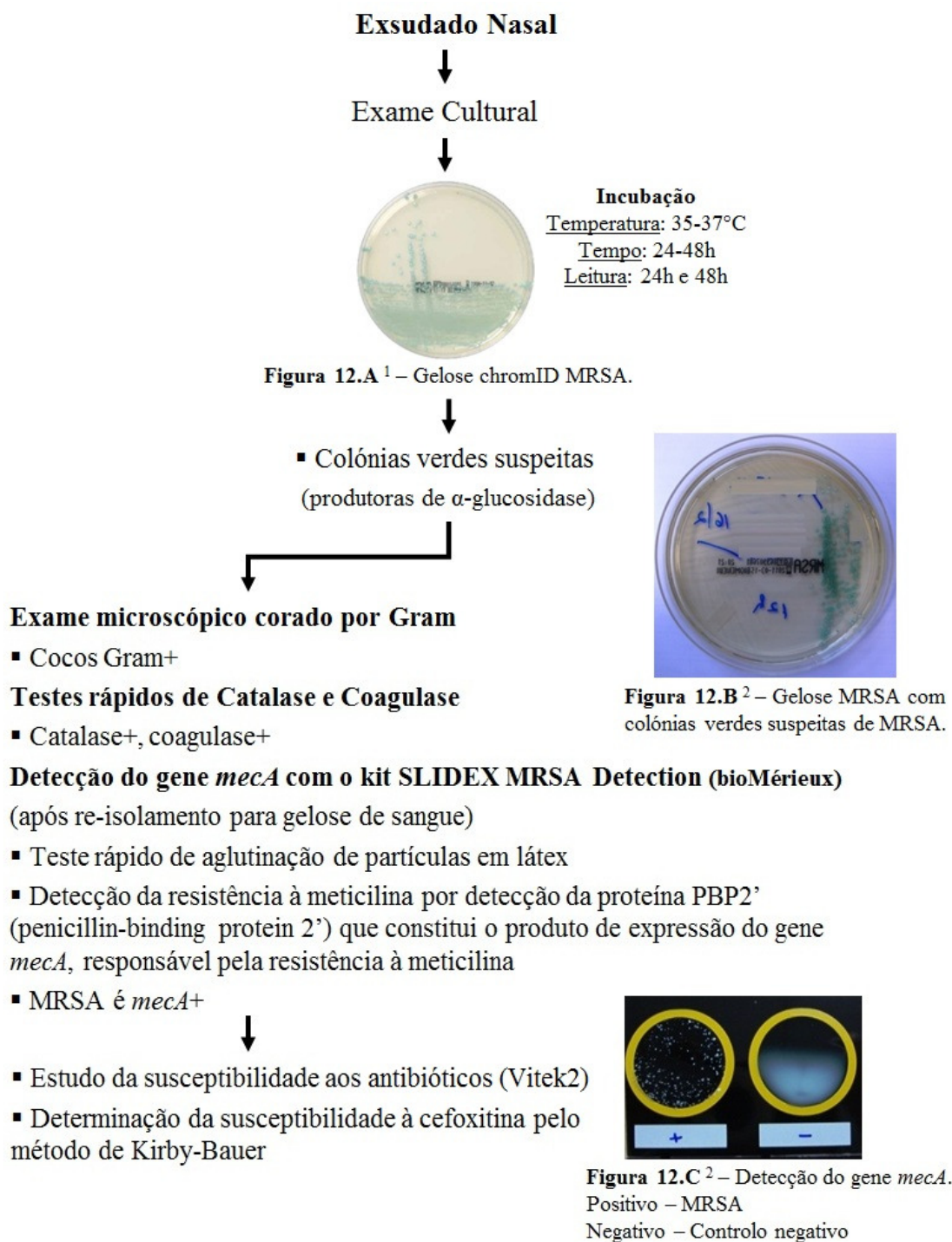
A zaragatoa deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível, em tubo sem meio de transporte. Caso o transporte seja demorado, deverá ser enviada em tubo com meio de transporte.

Pode ainda ser efectuada a colheita de outros produtos biológicos, nomeadamente exsudados faríngeos e perianais, ou zaragatoas colhidas em feridas crónicas.

12.1.2 Procedimento Laboratorial

O procedimento de diagnóstico laboratorial para detecção de MRSA encontra-se esquematizado no Esquema 12.A.

Após a detecção de MRSA, é necessário aplicar medidas de isolamento e descolonização do paciente colonizado.



Esquema 12.A – Procedimento de diagnóstico laboratorial para detecção de colonização por MRSA.

12.2 Produtores de ESBL

Uma estratégia de resistência de enterobacteriáceas aos antibióticos β -lactâmicos consiste na produção β -lactamases, enzimas capazes de hidrolizar agentes do grupo das penicilinas, inibindo a sua acção. As ESBL, β -lactamases de largo espectro, são enzimas capazes de hidrolizar vários antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas (também de 3ª e 4ª gerações) e monobactams (aztreonam). Não são capazes de hidrolisar carbapenems e cefamicinas (cefoxitina). A produção destas enzimas resulta de várias mutações nos genes que codificam as β -lactamases, levando à alteração das suas propriedades. *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as principais enterobacteriáceas capazes de produzir estas enzimas, constituindo agentes etiológicos de infecções comunitárias e nosocomiais. No entanto, já foi detectada a produção de β -lactamases por outras enterobacteriáceas.

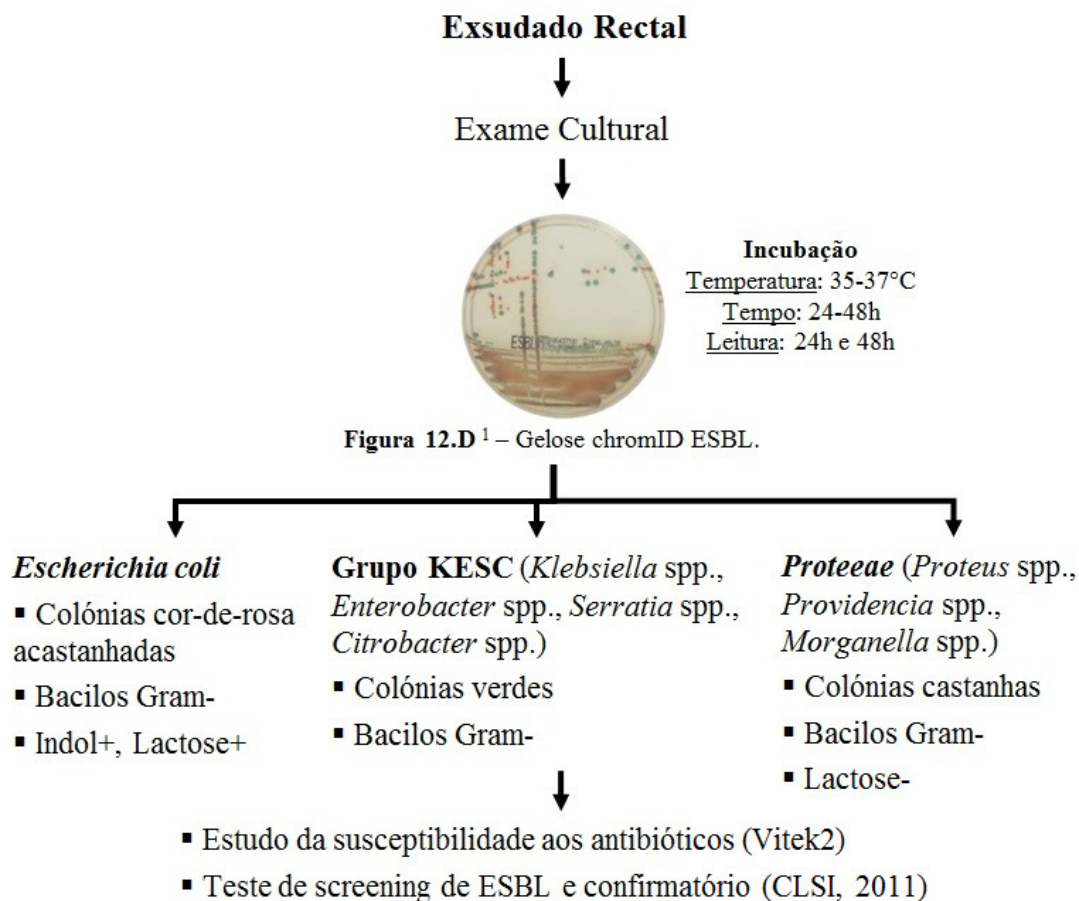
A actividade das ESBL é significativamente inibida na presença de inibidores de β -lactamases, nomeadamente o ácido clavulânico. Assim, um dos métodos mais clássicos de detecção fenotípica de ESBL é o teste de sinergismo do duplo disco, no qual são colocados discos de ceftriaxone, cefepime, cefotaxime e ceftazidime a 1.5 cm do disco de amoxicilina/ácido clavulânico. O aumento da zona de inibição entre o disco de amoxicilina/ácido clavulânico e os restantes discos (sinergismo) é indicativo da produção de ESBL.

12.2.1 Colheita

A pesquisa de estirpes ESBL é efectuada em amostras de exsudado rectal, fezes ou urina (de pacientes algaliados), cuja colheita já foi referida (Capítulos 5 e 6).

12.2.2 Procedimento Laboratorial

O procedimento de diagnóstico laboratorial para detecção de estirpes produtoras de ESBL encontra-se esquematizado no Esquema 12.B.



Esquema 12.B – Procedimento de diagnóstico laboratorial para detecção de estirpes produtoras de ESBL.

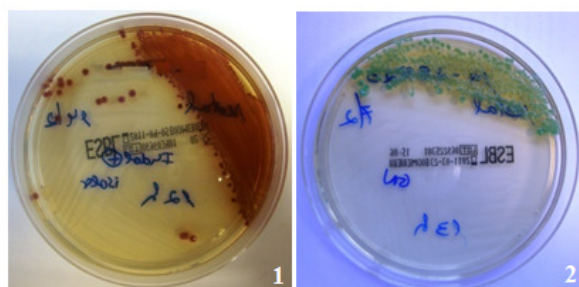


Figura 12.E² – Gelose ESBL.

- 1) Colónias castanhas indol+ (*Escherichia coli*);
2) Colónias verdes (Grupo KESC).

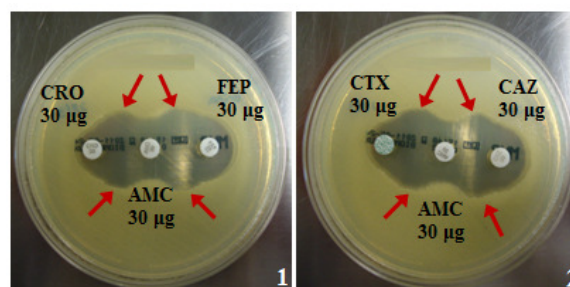


Figura 12.F² – Teste confirmatório de *Escherichia coli* produtora de ESBL (duplo disco com amoxicilina/ácido clavulânico), no qual se observa sinergismo (setas) entre amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ceftriaxone (CRO) (1), cefepime (FEP) (1), cefotaxime (CTX) (2) e ceftazidime (CAZ) (2).

13. IDENTIFICAÇÃO E SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

13.1 Sistemas Automáticos

No laboratório é utilizado o sistema automatizado **Vitek2** (bioMérieux) para a identificação de microrganismos, incluindo bactérias e fungos leveduriformes, e para o estudo da sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos (Figura 13.A).



Figura 13.A ⁵ – Vitek2.

Utiliza cartas de identificação baseadas no princípio API (Tabela 13.A).

Tabela 13.A – Cartas usadas no Vitek 2, durante o estágio.

Tipo	Carta	Função
Identificação	GN	Bactérias Gram-negativas
	GP	Bactérias Gram-positivas
	YST	Leveduras
Susceptibilidade a agentes antimicrobianos	GN26	Bacilos Gram negativos (ex: enterobacteriáceas)
	N093	Bacilos Gram-negativos não fermentadores (ex: <i>Pseudomonas</i> spp.)
	P580	<i>Staphylococcus</i> spp.
	P586	<i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus agalactiae</i>

Estas cartas permitem um maior nível de automatização, não requerem a adição de reagentes e são seladas para uma maior segurança. São realizadas leituras cinéticas de 15 em 15 min para optimização do tempo de resposta que, em média, é de 6-8 horas. Permitem a identificação de cerca de 98% dos microrganismos isolados na rotina com eficaz discriminação entre espécies, utilizam mais de 600 substratos colorimétricos, e permitem reduzir o número de testes suplementares.

Este aparelho possui um software de interpretação dos resultados que engloba várias referências bibliográficas. Efectua a validação automática dos resultados obtidos comparando a identificação e o antibiograma, e identifica os mecanismos de resistência associados a cada microrganismo.

A detecção e interpretação de mecanismos de resistência é crucial para prevenir a falha da terapêutica, o uso indiscriminado dos antibióticos e a monitorização das infecções nosocomiais.

13.2 Técnicas Manuais

13.2.1 Identificação

No laboratório é utilizada a galeria **API NH** (bioMérieux). Consiste num sistema padronizado para a identificação de *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. e *Moraxella catarrhalis*. Engloba mini-testes e uma base de dados. Permite também a biotipagem de *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus parainfluenzae* e a detecção de uma penicilinase.

A galeria possui 10 poços que contêm substratos desidratados onde são efectuados 12 testes de identificação baseados em reacções enzimáticas e na fermentação de açúcares (que se traduzem por alterações espontâneas de cor ou reveladas pela adição de reagentes). A leitura dos resultados é efectuada mediante uma lista de perfis.

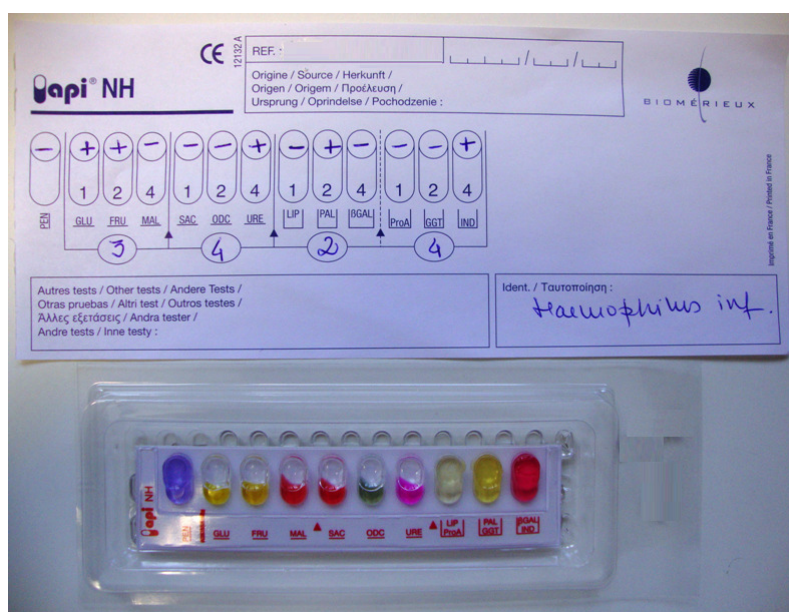


Figura 13.B² – Identificação de *Haemophilus influenzae* através do teste API NH.

13.2.2 Estudo da Susceptibilidade aos Agentes Antimicrobianos

No laboratório é utilizada a técnica de **difusão em agar**. Utiliza discos de papel absorvente impregnados com uma dose conhecida de antibiótico, que são depositados sobre a superfície da gelose de Mueller-Hinton (simples ou de sangue) previamente inoculada com uma suspensão de bactérias (de turbidez 0.50-0.63, escala de McFarland). O antibiótico difunde-se a partir do disco ao longo da gelose, diminuindo a sua concentração conforme aumenta a distância do disco. As geloses são colocadas a incubar a 37°C durante 18-24h (a gelose Mueller-Hinton de sangue é colocada em atmosfera de 5-10% de CO₂). À volta de cada disco forma-se um halo de inibição do crescimento bacteriano. O diâmetro dos halos correlaciona-se de forma linear com a CMI (concentração mínima inibitória), permitindo classificar o microrganismo em sensível, intermédio ou resistente a cada antibiótico testado. Para *Streptococcus* spp. são ainda utilizadas tiras de E-test, isto é, tiras impregnadas com um gradiente de antibiótico para a determinação de CMIs.

Para o estudo da susceptibilidade de fungos leveduriformes a diferentes antifúngicos são utilizadas tiras de E-test para a determinação de CMIs. Neste caso, é usada a gelose RPMI inoculada com uma suspensão de leveduras (de turbidez 1.8-2.2, escala de McFarland), e colocada a incubar a 37°C durante 18-24h.

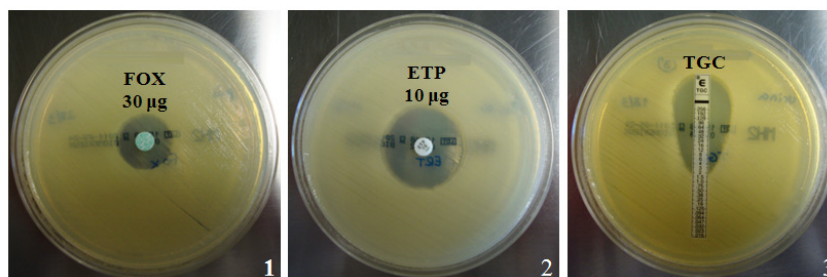


Figura 13.C² – Gelose Mueller-Hinton.

- 1) *Staphylococcus saprophyticus* – Cefoxitina (FOX); 2) *Escherichia coli* – Ertapenemo (ETP);
3) *Acinetobacter baumannii* – Tigeciclina (TGC).

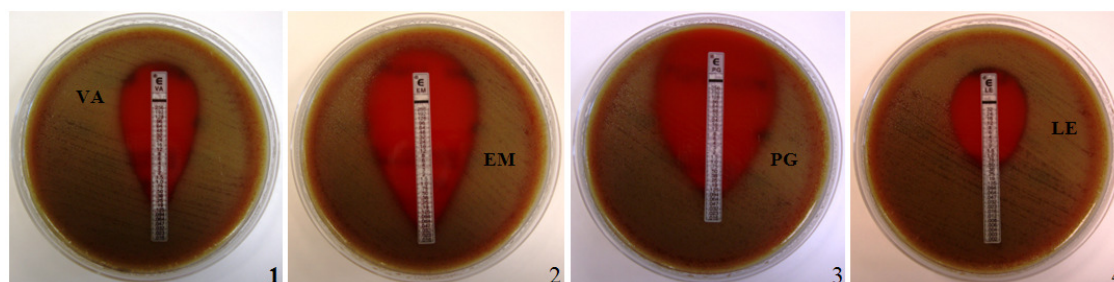


Figura 13.D² – Gelose Mueller-Hinton de Sangue (*Streptococcus pneumoniae*).

- 1) Vancomicina (VA); 2) Eritromicina (EM); 3) Penicilina G (PG); 4) Levofloxacina (LE).

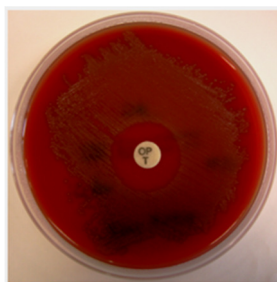


Figura 13.E² – Gelose de Sangue (*Streptococcus pneumoniae*). Teste da optoquina.

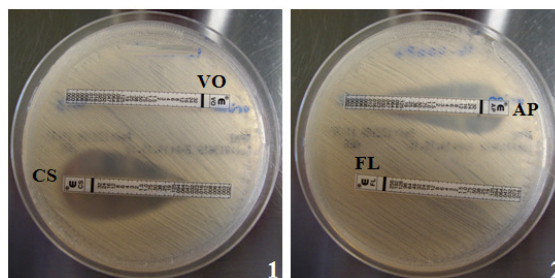


Figura 13.F² – Gelose RPMI (*Candida albicans*).
1) Voriconazol (VO) e Caspofungina (CS); 2) Anfotericina B (AP) e Fluconazol (FL).

É também utilizada a galeria **ATB Haemo** (bioMérieux) para a determinação da susceptibilidade de *Haemophilus* spp. e *Moraxella* spp. aos antibióticos em meio semi-sólido. A galeria possui 16 pares de cúpulas, das quais o primeiro par serve de padrão de crescimento (sem antibiótico) e os 10 seguintes contêm uma ou duas concentrações de antibióticos (os 5 últimos não são utilizados). É preparada uma suspensão bacteriana, as cúpulas são inoculadas e, após incubação, o resultado obtido permite classificar a estirpe em sensível, intermédia ou resistente.



Figura 13.G² – Galeria ATB Haemo inoculada com *Haemophilus* spp..

IMUNOLOGIA

1. INTRODUÇÃO

No laboratório de Imunologia são utilizados vários sistemas automatizados com base no princípio da quimioluminescência incluindo o Immulite 1000 (Siemens), Immulite 2000 (Siemens), Architect *i*2000_{SR} (Abbott) e Liaison (DiaSorin). Nestes aparelhos são determinados vários parâmetros que podem ser englobados em diferentes áreas, incluindo alergologia, endocrinologia, marcadores de anemia, marcadores tumorais, doenças infecciosas e auto-imunidade.

São ainda utilizadas outras técnicas com base nos princípios de radioimunoensaio e imunoensaio enzimático, e técnicas manuais para o doseamento de outros parâmetros.

Por fim, é utilizado o sistema semi-automatizado Hydrasys (Sebia), para o estudo das proteínas do soro e da hemoglobina.

O estágio em Imunologia foi coordenado pela Dr^a Ana Maria Lory e decorreu no período de 4 de Abril a 31 de Maio (320h).

2. QUIMIOLUMINESCÊNCIA

2.1 Aparelhos

No laboratório de Imunologia são utilizados os aparelhos Immulite 1000, Immulite 2000, Architect *i*2000_{SR} e Liaison, sistemas automatizados fechados que têm como base o princípio da quimioluminescência, para a detecção e/ou quantificação de antígenos, anticorpos e analitos em amostras, controles e calibradores.

2.1.1 Immulite 1000 e 2000

Os sistemas Immulite 1000 e 2000 (Figuras 2.A e 2.B) utilizam esferas de poliestireno revestidas com uma camada de anticorpos ou antígenos específicos de cada kit de teste, contidas ou dispensadas em tubos de reação próprios que constituem os recipientes onde ocorrem os processos de incubação, lavagem e desenvolvimento do sinal. Nestes tubos são dispensadas as amostras, os reagentes (conjugado de fosfatase alcalina) específicos de cada kit, e água. Cada tubo de reação é colocado a incubar a 37°C durante 30-60 min (dependendo do tipo de análise) em movimento de agitação. Após a incubação, é sujeito a um movimento de rotação sobre o seu eixo vertical, ocorrendo uma separação da esfera revestida da mistura reaccional. A esfera revestida é lavada, sendo removidas as camadas não ligadas. É adicionado um substrato de quimioluminescência, isto é, um substrato luminogénico (fosfato de adamantil dioxetano) que reage com a camada de fosfatase alcalina ligada à esfera revestida, com consequente emissão de luz. A luz emitida é detectada pelo tubo fotomultiplicador que realiza contagens de fótons (contagens por segundo – cps) e os resultados são calculados. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de analito inicialmente contida em cada amostra.

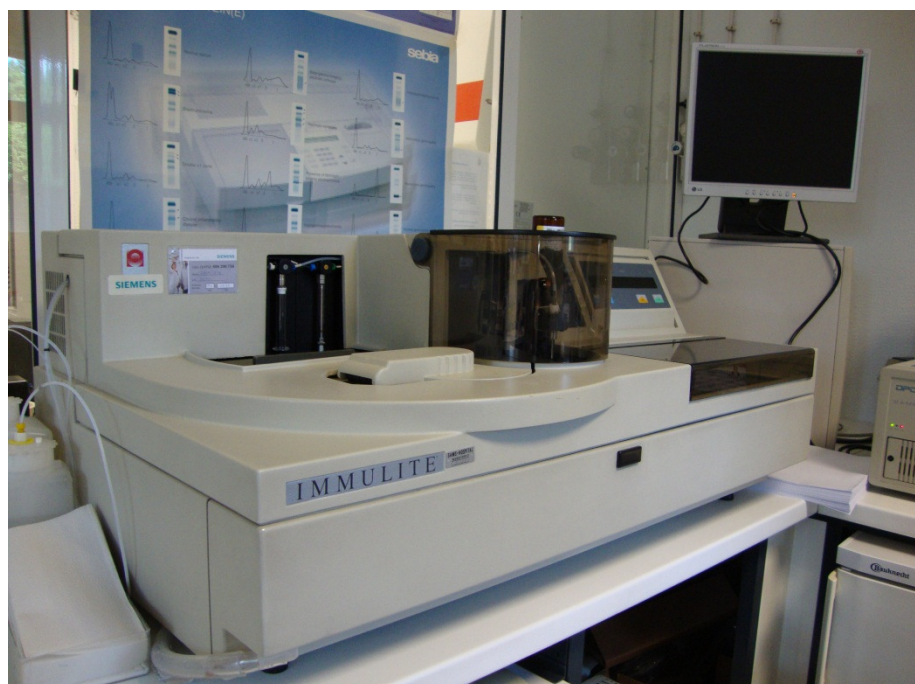


Figura 2.A² – Immulinite 1000.



Figura 2.B² – Immulinite 2000.

2.1.2 Architect *i2000*_{SR} System

O sistema Architect *i2000*_{SR} (Figura 2.C) utiliza micropartículas paramagnéticas revestidas com uma camada de anticorpos ou antígenos específicos de cada ensaio, dispensadas em cuvetes de reacção, juntamente com as amostras. A mistura de reacção é homogenizada e colocada a incubar, formando-se os complexos antígeno-anticorpo. Um íman atrai as micropartículas paramagnéticas para uma parede da cuvete e a restante mistura não ligada é lavada. É adicionado o conjugado marcado com acridínio quimioluminescente, que se combina com os complexos imunitários, e a mistura de reacção é colocada novamente a incubar. A mistura é lavada, para remoção dos materiais não ligados. É dispensada a solução pré-activadora para que o sistema óptico efectue uma leitura de background, pois esta solução cria um ambiente ácido que inibe a libertação prematura de energia, ajuda a evitar a aglomeração das micropartículas e elimina a matéria corante do acridínio do conjugado combinado com o complexo de micropartículas, preparando a mistura para a etapa seguinte. É adicionada a solução activadora e o acridínio é sujeito a uma reacção de oxidação que causa a reacção de quimioluminescência, provocando a emissão de luz. O sistema óptico mede a emissão por quimioluminescência durante um período pré-determinado de tempo, para obter leituras em unidades relativas de luz (RLU) e para as converter em unidades de concentração de analitos ou em interpretações qualitativas para os ensaios de índice (cutoff).



Figura 2.C² – Architect *i2000*_{SR}.

2.1.3 Liaison

O sistema Liaison (Figura 2.D) utiliza partículas paramagnéticas revestidas com anticorpos ou antígenos específicos de cada ensaio (fase sólida), que são introduzidas nas cuvetes de reacção juntamente com as amostras. É depois adicionado o conjugado de isoluminol (fase líquida) que se combina com os complexos imunitários formados. Os ensaios realizados neste aparelho podem incluir uma, duas ou três fases de incubação e de lavagem. Depois do último ciclo de lavagem, a cuvette de reacção é transportada para a câmara de medição, onde são adicionados os reagentes iniciadores que induzem uma reacção de quimioluminescência. O sinal luminoso e, conseqüentemente, a quantidade de conjugado de isoluminol ligado, é medido por um fotomultiplicador em unidades relativas de luz (RLU) e é indicativo da concentração de analito presente na amostra.

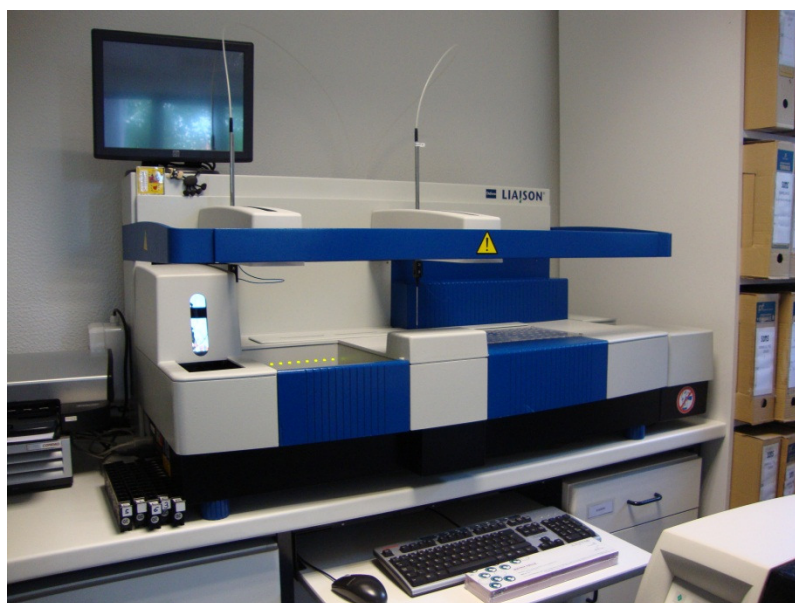


Figura 2.D² – Liaison.

2.1.4 Calibração

A calibração consiste no conjunto de operações que estabelecem a relação, linear ou não linear, entre o sinal analítico obtido pelos aparelhos e a concentração dos analitos. Para isso é utilizado um conjunto de soluções que contêm o analito em concentrações conhecidas, e os sinais analíticos obtidos são utilizados para construir uma curva de calibração. Esta permite obter valores dos analitos para cada amostra de concentração desconhecida.

Os métodos de calibração utilizam, geralmente, uma curva mãe elaborada pelo fabricante para cada lote de reagentes, que é ajustada a cada aparelho e armazenada. Não é necessário executar uma curva padrão diariamente graças à reprodutibilidade de pipetagem, tempo exacto, ambiente de temperatura controlada e estabilidade prolongada dos reagentes. Os métodos de calibração incluem o método dos quatro parâmetros logísticos, o método ponto-a-ponto, o método de regressão linear, o método de ensaio de cutoff, entre outros.

2.1.5 Parâmetros

Os parâmetros determinados nestes aparelhos são detectados e/ou quantificados em amostras de soro, com a excepção do ACTH e renina (em plasma), desoxipiridinolina (na primeira urina da manhã) e cortisol (urina de 24h).

Nos Capítulos 2 de Hematologia e 6 de Microbiologia encontram-se os procedimentos de colheita e conservação das amostras de soro e plasma, e urina única, respectivamente.

As amostras de urina de 24h incluem todas as micções de um dia (com a excepção da primeira micção) e a primeira micção do dia seguinte. As micções são colhidas da mesma forma que as amostras de urina única e são colocadas num recipiente de grandes dimensões que deve permanecer tapado e protegido do calor e da luz. A sua conservação é efectuada a uma temperatura de 4°C.

Nas tabelas seguintes encontram-se os parâmetros determinados por quimioluminescência nos aparelhos referidos, assim como os respectivos valores de referência, de acordo com cada área.

Tabela 2.A – Parâmetros doseados no âmbito da Alergologia.

Parâmetro	Valores Normais	Unidades	Aparelho
IgE total	0-1 ano	<29	UI/mL
	1-2 anos	<49	
	2-3 anos	<45	
	3-9 anos	<52	
	Adulto	<87	
Rastreio de IgE contra alergénios inalantes	Não reactivo <0.9; Reactivo ≥1.1; Indeterminado: 0.9-1.1		S/Co
Rastreio de IgE contra alergénios alimentares e Detecção de IgE específicas	Classe	Reactividade	kU/L
	0	0.00-0.34	
	I	0.35-0.69	
	II	0.70-3.49	
	III	3.50-17.49	
	IV	17.5-52.49	
	V	52.50-99.99	
	VI	≥100	

Immulate
2000

Tabela 2.B – Parâmetros doseados no âmbito da Endocrinologia.

Glândula/ /Sistema	Parâmetro	Valores de Referência			Unid.	Aparelho
		Homem	Mulher			
Tiróide	Anticorpos anti-tiroglobulina	<40		UI/mL	Immulite 2000	
	Anticorpos anti-peroxidase	<35		UI/mL		
	Paratiróide	Tiroglobulina	1.7-60.0		ng/mL	Immulite
Calcitonina		<8.4	<5.0	pg/mL	1000	
Supra-Renal	Hormona adrenocorticotrófica	<46		pg/mL	Immulite 2000	
	Cortisol urinário	4.3-176.0		µg/24h	Architect i2000 _{SR}	
Fertilidade	Testosterona total	20-49 anos	Ovulação	ng/mL	Immulite 2000	
		2.6-16.0	<0.8			
		>50 anos	Pós-menopausa			
	Androstenediona	1.8-7.7	<0.7	ng/mL		
Diagnóstico Pré-Natal	Proteína A do plasma associada à gravidez	Mediana	11ª semana: 2.18	mUI/mL	Immulite 2000	
	β-HCG livre	Mediana	11ª semana: 44.70	ng/mL		
	Estriol livre	Mediana	15ª semana: 2.31 16ª semana: 2.87	ng/mL		
Pâncreas	Insulina	6-25		µIU/mL		
Desenvolvimento	Hormona do crescimento	<1.0	<8.0	ng/mL	Immulite 1000	
		<20 (criança)				
Hipertensão Arterial	Renina	Posição erecta	4.4-46.1	µUI/mL	Liaison	
		Posição deitada	2.8-39.9			
Metabolismo Ósseo	Desoxipiridinolina (<25 anos)	2.3-5.4	3.0-7.4	nM /mM creatinina	Immulite 1000	
	Osteocalcina	2.0-21.0		ng/mL		

Tabela 2.C – Parâmetros doseados no diagnóstico de anemias.

Parâmetro	Valores de Referência			Aparelho
	Homem	Mulher	Unidades	
Vitamina B12	193-952	193-982	pg/mL	Immulite 2000
Ácido Fólico	3-17		ng/mL	

Tabela 2.D – Marcadores tumorais doseados.

Marcador Tumoral	Valores de Referência		Aparelho
	Indivíduos normais	Unidades	
SCC	≤1.5	ng/mL	Architect i2000 _{SR}
Cyfra 21-1	≤2.08	ng/mL	
NSE	<18.3	µg/L	Liaison

Tabela 2.E – Parâmetros doseados no diagnóstico de doenças infecciosas.

Parâmetro		Valores de Referência			Aparelho
		Negativo	Positivo	Unidades	
Herpes	HSV 1/2 IgM	<0.9	≥1.1	cutoff	Liaison
	HSV 1/2 IgG	Não reactivo	Reactivo	-	Immulate 1000
Varicela-Zona	VZV IgM	<1.0	≥1.0	cutoff	Liaison
	VZV IgG	<150	≥150	mUI/mL	
Citomegalovírus	CMV IgM	<15	≥30	UA/mL	
	CMV IgG	<0.4	≥0.6	UI/mL	
Mononucleose Infecciosa	EBV (capsídeo) IgM	<20	≥40	U/mL	
	VCA (capsídeo) IgG	<20	≥20	U/mL	
	EBNA (núcleo) IgG	<5	≥20	U/mL	
Hepatite A	HAV IgM	<0.8	≥1.2	S/Co	Architect i2000 _{SR}
	HAV IgG	<1.0	≥1.0	S/Co	
Hepatite B	Ag HBs	<1.0	≥1.0	S/Co	
	Ag HBe	<1.0	≥1.0	S/Co	
	Ac anti-HBs	<10.0	≥10.0	mUI/mL	
	Ac anti-HBc IgM	<1.0	≥1.0	S/Co	
	Ac anti-HBc	<1.0	≥1.0	S/Co	
	Ac anti-HBe	>1.0	≤1.0	S/Co	
Hepatite C	Ac anti-HCV	<1.0	≥1.0	S/Co	
HIV	HIV Ag/Ac	<1.0	≥1.0	S/Co	Liaison
Toxoplasmose	Toxo IgM	<0.83	≥1.0	S/Co	
	Toxo IgG	<1.6	≥3.0	UI/mL	
Rubéola	Rubéola IgM	<0.75	≥1.0	S/Co	Liaison
	Rubéola IgG	<5.0	≥10.0	UI/mL	
	Rubéola IgM	<20	≥25	UA/mL	

Tabela 2.F – Parâmetros doseados no âmbito da Auto-Imunidade.

Parâmetro		Valores de Referência			Aparelho
		Negativo	Positivo	Unidades	
Rastreio ANA		<1.5	≥1.5	cutoff	
Autoanticorpos anti-cardiolipina			15.0-39.9 (fraco)		Liaison
	IgM	<13.0	40.0-79.9 (moderado)	UMPL/mL	
			>80.0 (forte)		
	IgG	<20.0	20.0-39.9 (fraco)	UGPL/mL	
			40.0-79.9 (moderado)		
			>80.0 (forte)		

Seguidamente é apresentado o fundamento teórico e o interesse clínico da determinação de cada parâmetro referido, de acordo com cada área.

2.2 Alergologia

A alergia consiste numa reacção de hipersensibilidade mediada por IgE. É despoletada por antígenos ambientais comuns, denominados por alérgenos. Estes, após ingestão ou inalação, activam a proliferação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, com consequente produção de anticorpos, neste caso, IgE. Estes anticorpos ligam-se a receptores específicos na superfície de mastócitos e basófilos, sensibilizando estas células. Uma nova exposição aos mesmos alérgenos provoca a sua desgranulação, com a libertação de mediadores vasoactivos como histaminas, leucotrienos e prostaglandinas, que levam à vasodilatação e à contracção dos músculos lisos.

Os mecanismos imunológicos que envolvem anticorpos IgE são normalmente activados em parasitoses. No entanto, alguns indivíduos apresentam uma predisposição hereditária responsável por hipersensibilidade a antígenos ambientais comuns, com produção excessiva de IgE e consequentes lesões tecidulares. As manifestações clínicas incluem anafilaxia, rinite alérgica, asma e eczema, e ainda vómitos e diarreias.

Quanto mais alérgenos causarem a reacção de hipersensibilidade e quanto maior o grau de exposição, maior será o nível de IgE total sérico. O seu doseamento pode auxiliar na detecção precoce de alergias nas crianças e no diagnóstico das atopias. Um resultado elevado pode ocorrer em indivíduos não alérgicos e, por isso, deve ser esclarecido com o rastreio de IgE contra painéis de alérgenos alimentares e inalantes. Um resultado positivo no teste de rastreio indica a presença, no soro, de anticorpos contra um ou mais alérgenos desse painel. A amostra deve ser novamente testada para cada um desses alérgenos, individualmente, para a identificação de alérgenos específicos (Tabela 2.G).

Tabela 2.G – IgE específicas pesquisadas mais frequentemente no laboratório.

Grupo	Alergénio
Ácaros	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
	<i>Dermatophagoides farinae</i>
	<i>Lepidoglyphus destructor</i>
Pó	Pó da casa
	<i>Dactylis glomerata</i> (panasco)
	<i>Lolium perene</i> (azevém)
Gramíneas	<i>Poa pratensis</i> (erva de febra)
	<i>Secale cereale</i> (centeio)
Ervas	<i>Parietaria officinalis</i> (alfavaca de cobra)
Árvores	<i>Olea europea</i> (Oliveira)
	<i>Platanus vulgaris</i> (plátano)
Epitélios	Pêlo de gato
	Pêlo de cão
Alimentos	α -Lactalbumina
	β -Lactoglobulina
	Caseína
	Leite de vaca
	Clara de ovo
	Gema de ovo
	Camarão

2.3 Endocrinologia

2.3.1 Função da Tiróide e Paratiróide

A tiróide é uma glândula endócrina, histologicamente constituída por um epitélio de células cúbicas foliculares que envolvem um conjunto de folículos. Estes contêm colóide, um material proteico composto por tiroglobulina e hormonas tiroideias (triiodotironina T_3 , e tiroxina T_4) armazenadas. Entre os folículos existem células parafoliculares, responsáveis pela síntese de calcitonina.

As células foliculares sintetizam tiroglobulina, que é secretada para o colóide, e recolhem iodo do sangue. A enzima peroxidase, uma proteína integral da membrana celular, medeia a síntese das hormonas tiroideias a partir de tiroglobulina e iodo.

As disfunções autoimunes da tiróide caracterizam-se pela produção de autoanticorpos anti-tiroideus, nomeadamente anti-peroxidase, anti-tiroglobulina, anti-receptores-TSH (hormona estimuladora da tiróide) e anti-TRH (hormona libertadora de tirotrofina). Os anticorpos anti-peroxidase e anti-tiroglobulina são pesquisados no laboratório, visto serem encontrados em

praticamente todos os casos de tiroidite de Hashimoto (hipotireoidismo) e em alguns casos de doença de Graves (hipertireoidismo).

O doseamento da tiroglobulina é útil no diagnóstico de hipotireoidismo, pois a sua síntese ocorre unicamente na tireóide. É importante pesquisar simultaneamente anticorpos anti-tiroglobulina, pois a sua presença pode interferir com este doseamento.

Por sua vez, a calcitonina está envolvida na regulação da absorção óssea, manutenção do balanço de cálcio e homeostase. Inibe a reabsorção óssea e diminui os níveis plasmáticos de cálcio e fósforo, sendo libertada em resposta à hipercalcémia. Níveis elevados de calcitonina encontram-se associados ao carcinoma medular da tireóide que afecta as células parafoliculares, e a casos de hiperparatiroidismo.

2.3.2 Função da Glândula Supra-Renal

A hormona adrenocorticotrófica (ACTH) é sintetizada pela adenohipófise, segundo um ritmo circadiano. Estimula a síntese e secreção de mineralocorticóides, glucocorticóides (incluindo o cortisol) e androgénios, no córtex supra-renal.

O cortisol é a principal hormona glucocorticóide. Tem como função a regulação do metabolismo dos hidratos de carbono e da distribuição de electrólitos e água. Tem também um efeito imunossupressor e anti-inflamatório. Os seus níveis plasmáticos variam segundo um ritmo circadiano, atingindo valores mais elevados de manhã que diminuem para cerca de metade ao fim do dia.

Os valores de ACTH e cortisol são utilizados na avaliação do funcionamento da hipófise e no diagnóstico diferencial de hipersecreção e insuficiência da glândula supra-renal. Exemplos são o síndrome de Cushing que pode resultar de um adenoma da hipófise (excesso de ACTH), de um adenoma ou carcinoma da glândula supra-renal (excesso de cortisol), de produção ectópica de ACTH ou CRH (hormona libertadora de corticotrofina), ou da administração de glucocorticóides, e ainda a doença de Addison que pode resultar de uma insuficiência primária do córtex supra-renal provocada pela destruição auto-imune (causa mais frequente) da glândula, exibindo níveis baixos de cortisol e elevados de CRH e ACTH. Níveis baixos de cortisol podem ainda resultar de defeitos na sua via de síntese. Caso a insuficiência do córtex supra-renal seja secundária, por exemplo, a uma insuficiência da adenohipófise, observam-se níveis baixos de ACTH.

O cortisol urinário reflecte o nível de cortisol plasmático livre, que é biologicamente activo. Quando há sobreprodução de cortisol, o cortisol plasmático não ligado aumenta

desproporcionalmente, assim como a excreção urinária. A avaliação do cortisol urinário é um meio sensível de determinar a hiperfunção da glândula supra-renal.

2.3.3 Fertilidade

A testosterona é uma hormona esteróide e um potente androgénio. A androstenediona, sintetizada no córtex supra-renal, constitui um esteróide precursor da testosterona e da estrona. No homem, a testosterona é primariamente produzida nas células de Leydig. Tem como principais funções estimular o desenvolvimento das características sexuais primárias e secundárias do homem e, juntamente com a FSH (hormona estimuladora do folículo), estimular a espermatogénese. Na mulher, os níveis de testosterona são bastante inferiores aos níveis encontrados no homem. Parte da testosterona é sintetizada pelas células da teca nos ovários e pelo córtex supra-renal, enquanto que a maior parte resulta da conversão periférica da androstenediona.

Níveis elevados de testosterona no homem podem ser provocados por puberdade precoce, tumores testiculares ou supra-renais, ou hiperplasia supra-renal, enquanto que níveis diminuídos caracterizam o hipogonadismo ou adenomas da hipófise. Na mulher, níveis elevados de testosterona caracterizam o síndrome dos ovários poliquísticos e tumores ováricos ou adrenais, enquanto que níveis diminuídos caracterizam a hipofunção dos ovários.

Os valores de testosterona e androstenediona têm ainda interesse em casos de hirsutismo e virilização na mulher, derivados do excesso de testosterona (ou de terapêuticas com androgénios).

2.3.4 Diagnóstico Pré-Natal

A proteína A do plasma associada à gravidez (PAPP-A) é uma glicoproteína derivada da placenta. Os seus níveis no soro materno aumentam com a idade gestacional. Apesar de as suas funções serem ainda desconhecidas, níveis baixos de PAPP-A estão associados a anomalias cromossómicas no feto.

A gonadotropina coriónica humana (hCG) é uma hormona glicoprotéica que se encontra no soro e urina da mulher durante a gravidez. É uma molécula constituída por duas subunidades, α e β , que podem ocorrer na forma ligada ou livre. É a subunidade β que lhe confere a sua actividade biológica.

A maior parte do estriol que se encontra no soro materno é sintetizado pelo feto e pela placenta. Ao atravessar a placenta, o estriol é rapidamente metabolizado e passa a encontrar-se sob a forma não conjugada na circulação e sob a forma conjugada na urina. Os níveis de estriol aumentam com a idade gestacional, e a partir da 40ª semana diminuem gradualmente. Níveis persistentemente baixos ou de queda súbita sugerem problemas fetais.

O diagnóstico pré-natal é efectuado no primeiro e segundo trimestres da gravidez. A determinação de PAPP-A e β -HCG livre no soro materno no primeiro trimestre da gravidez, combinada com a idade da mãe e com a determinação da espessura da translucência da nuca fetal, é bastante útil no rastreio pré-natal do síndrome de Down e de outras anomalias cromossómicas. O doseamento do estriol, em conjunto com outros parâmetros (α -fetoproteína e β -HCG), é efectuado no segundo trimestre, e é também útil no controlo de complicações durante a gravidez, incluindo diabetes gestacional, hipertensão, entre outros. Os resultados finais do diagnóstico pré-natal são dados com base em estudos probabilísticos.

2.3.5 Função do Pâncreas

A insulina é produzida pelas células β do pâncreas e secretada em resposta ao aumento da glicémia, sendo a única hormona hipoglicemizante. É muito importante na regulação do armazenamento e utilização de hidratos de carbono.

A relação entre os níveis de insulina e glucose no soro fica comprometida em indivíduos que sofrem de insulinoma ou diabetes *mellitus*. O insulinoma consiste num tumor do pâncreas derivado das células β , responsável pelo aumento da insulina no soro, independentemente da glicémia. A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica crónica caracterizada por hiperglicémia, e resulta da destruição auto-imune das células β e consequente falha na síntese de insulina, ou da intolerância das células à insulina e simultânea incapacidade de secreção compensatória pelas células β .

O doseamento da insulina é útil na monitorização da diabetes *mellitus* e no diagnóstico de insulinoma.

2.3.6 Desenvolvimento

A hormona do crescimento é uma proteína sintetizada na adenohipófise. Estimula o crescimento ósseo assim como o metabolismo em geral.

O excesso desta hormona induz o crescimento de todos os tecidos e órgãos e ainda algumas manifestações sistémicas como hipertensão arterial e diabetes *mellitus*. Nas crianças causa o crescimento acentuado das epífises com um aumento de estatura, denominado por gigantismo, e nos adultos induz o aumento das extremidades por alargamento ósseo e muscular, assim como de vários órgãos, condição denominada por acromegália. A deficiência desta hormona nas crianças induz o nanismo hipofisário, caracterizado por um crescimento lento, com consequente estatura baixa em relação à idade cronológica.

O doseamento da hormona de crescimento tem interesse no diagnóstico de formas de secreção inapropriada desta hormona.

2.3.7 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial pode ser primária ou essencial (causa desconhecida) ou secundária (a insuficiência renal, distúrbios hormonais, entre outras).

A renina é uma enzima proteolítica sintetizada pelas células justaglomerulares dos rins e armazenada em grânulos. É libertada em resposta à diminuição do volume sanguíneo, da pressão arterial e do sódio. Estimula a produção de aldosterona ao nível do córtex supra-renal. Os níveis de renina e aldosterona constituem bons indicadores da actividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que é muito importante para a homeostase hídrica e salina e para a regulação da pressão arterial.

Os níveis de renina no plasma variam com a posição do corpo (deitado versus erecto). Aumentam no aldosteronismo secundário, insuficiência renal crónica, doença de Addison, hipertensão arterial essencial, tumores renais que sintetizam renina, entre outros, e diminuem no aldosteronismo secundário, durante terapia com vasopressina, por retenção de sais, entre outros.

O doseamento da renina é útil no diagnóstico e no tratamento de diferentes tipos de hipertensão arterial.

2.3.8 Metabolismo Ósseo

O principal constituinte da matriz orgânica dos ossos é o colagénio tipo 1, uma proteína cuja estrutura consiste numa tripla hélice de glicina, hidroxiprolina e prolina. As moléculas de colagénio tipo 1 associam-se entre si através de pontes cruzadas de piridinolina e desoxipiridinolina.

O osso é um tecido dinâmico, uma vez que se verifica um equilíbrio entre a reabsorção e a formação. Se a reabsorção exceder a formação, ocorre perda de material ósseo. A desoxipiridinolina é libertada para a circulação durante a reabsorção e é excretada na urina sem ser metabolizada. Os seus níveis na urina são úteis na avaliação da reabsorção óssea, incluindo em mulheres pós-menopausa diagnosticadas com osteoporose e a receber terapia anti-absorção. A osteocalcina, por sua vez, é uma proteína produzida pelos osteoblastos e libertada para a circulação, sendo também influenciada pelas moléculas reguladoras do cálcio, nomeadamente a calcitonina, paratormona e vitamina D, necessárias no processo de mineralização óssea. O nível sérico de osteocalcina constitui um bom marcador de formação óssea.

2.4 Marcadores de Anemia

A anemia caracteriza-se por uma diminuição da concentração de glóbulos vermelhos com consequente diminuição da concentração de hemoglobina funcional circulante.

Existem vários tipos de anemia, entre os quais a anemia megaloblástica, na qual se verifica um assincronismo de maturação núcleo/citoplasma dos eritroblastos, provocado, na maioria dos casos, pela deficiência em vitamina B12 ou ácido fólico, essenciais para a hematopoiese.

A deficiência em vitamina B12 pode resultar de alimentação inadequada, mal-absorção, anemia perniciosa, deficiência de transportadores, entre outros, enquanto que níveis elevados podem resultar de doenças do fígado, síndromes mieloproliferativas ou uso de suplementos vitamínicos. A deficiência em vitamina B12 é normalmente acompanhada de níveis de ácido fólico normais ou elevados no soro, e níveis baixos nos eritrócitos.

A deficiência em ácido fólico resulta, geralmente, de dieta ou absorção deficiente, alcoolismo ou aumento da necessidade (gravidez, lactação ou diálise).

O doseamento de ácido fólico e vitamina B12 é útil no diagnóstico e tratamento das anemias.

2.5 Marcadores Tumorais

No organismo verifica-se um equilíbrio fisiológico entre a renovação e a morte celulares, em todos os órgãos e tecidos. Em condições normais, o número total de cada tipo celular mantém-se constante. Caso haja um descontrolo, as células passam a multiplicar-se em excesso, produzindo um tumor. Os tumores podem ser benignos, caso sejam incapazes de crescer indefinidamente e de invadir os tecidos adjacentes, ou malignos, caso sejam capazes de crescer descontroladamente e de invadir tecidos adjacentes e não adjacentes, através da formação de metástases.

Um marcador tumoral consiste numa substância sintetizada pelas células tumorais e é detectado no tecido tumoral, sangue ou fluidos corporais. Pode actuar como antigénio celular (CA 125), hormona (calcitonina), enzima (NSE), proteína sérica (imunoglobulinas monoclonais), ou outros.

O marcador tumoral ideal deve ser específico de cada tumor, libertado proporcionalmente ao volume do tecido tumoral, detectável num estadio precoce da doença e doseável com fiabilidade. Na ausência destas características, o valor diagnóstico de cada marcador tumoral está dependente da sua especificidade e sensibilidade.

2.5.1 SCC

O antigénio associado ao carcinoma de células escamosas (Ag SCC) é uma fracção do antigénio tumoral TA-4, obtido a partir de tecido de carcinoma de células escamosas do colo do útero. Os níveis séricos de TA-4 em mulheres com carcinoma das células escamosas cervicais são frequentemente elevados relativamente aos observados em mulheres saudáveis, e podem reflectir a extensão desta patologia, sendo úteis no prognóstico, detecção da recorrência e monitorização da evolução. Os estadios mais avançados do carcinoma estão associados a níveis mais elevados de Ag SCC. Determinações sequenciais permitem detectar recorrência e presença de doença residual após terapêutica, e monitorizar a resposta à terapêutica.

2.5.2 Cyfra 21-1

A citoqueratina 19 pertence a um grupo de citoqueratinas, importantes constituintes do citoesqueleto das células epiteliais. Os filamentos das citoqueratinas são pouco solúveis mas, após degradação proteolítica, formam-se fragmentos de citoqueratina solúveis que são libertados nos fluidos corporais.

Níveis elevados de fragmentos são encontrados no soro de indivíduos com carcinoma do pulmão (especialmente de não-pequenas células), assim como outros carcinomas, nomeadamente o carcinoma da bexiga. Os níveis correlacionam-se com o estadio da doença, indicando a sua utilidade como meio auxiliar de diagnóstico do carcinoma do pulmão e de monitorização da sua resposta durante a terapêutica.

2.5.3 NSE

A enolase é uma enzima que participa no metabolismo da glucose. A sua molécula é constituída por 2 subunidades de 3 tipos (α , β e γ). A enolase específica dos neurónios (NSE) (isoformas $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$) é encontrada em tumores malignos com diferenciação neuroendócrina, nomeadamente o carcinoma do pulmão de pequenas células e o neuroblastoma. Os níveis de NSE reflectem a taxa de morte celular uma vez que a sua libertação só ocorre por ruptura das células.

A NSE é um marcador muito importante na confirmação do diagnóstico, controlo da eficácia da terapêutica, avaliação do estado da doença e detecção da recorrência destes tumores malignos.

2.6 Doenças Infecciosas

O diagnóstico serológico das doenças infecciosas é realizado através da detecção de anticorpos, sintetizados pelo sistema imunitário em resposta à presença de agentes infecciosos no organismo. Os anticorpos IgM são detectáveis alguns dias após o início da infecção e posteriormente aparecem os anticorpos IgG. Ambos os tipos atingem um pico por volta dos 10 dias. Após a resolução da infecção, os níveis de IgM mantêm-se por 3-9 meses no soro, enquanto que os níveis de IgG mantêm-se durante muitos anos.

A presença de IgM (com ou sem IgG) é sinónima de infecção activa (primária ou recorrente), e normalmente o seu doseamento deve ser confirmado. A presença de IgG sem

IgM é sinónima de exposição prévia ao agente e de imunização contra este. A presença de IgG numa única amostra é insuficiente para distinguir entre infecção activa ou resolvida.

Em grávidas, a avaliação do estado serológico em relação às infecções por citomegalovírus e *Toxoplasma gondii* requer ainda a determinação da avidéz de IgG, uma vez que esta permite distinguir infecções com mais de três meses (elevada) de infecções mais recentes (avidéz baixa).

2.6.1 Herpes

Herpes é uma infecção causada pelos vírus Herpes Simplex (HSV). Existem dois serotipos e, na maioria dos casos, o HSV-1 causa lesões orais, enquanto que o HSV-2 causa lesões genitais e/ou anais. A transmissão dá-se através do contacto com lesões activas, fluidos biológicos contaminados (saliva e fluidos sexuais) ou objectos contaminados.

Estas infecções são geralmente benignas, mas podem surgir complicações como queratite herpética, encefalite, herpes neonatal e eczema herpético. Consequências mais graves podem ocorrer em mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos.

O diagnóstico serológico é realizado através da detecção de anticorpos. A infecção primária deve ser confirmada por cultura viral (não efectuada no laboratório), que constitui o método de referência para o diagnóstico e tipagem do HSV.

2.6.2 Varicela-Zona

O vírus Varicela-Zona (VZV) é um herpesvírus muito contagioso, cuja transmissão dá-se por contacto com as vesículas, inalação de gotículas de saliva ou transmissão vertical. A Varicela (infecção viral primária) ocorre maioritariamente nas crianças e é, normalmente, de evolução benigna. Adultos, grávidas e indivíduos imunocomprometidos podem manifestar consequências mais graves. O vírus permanece em estado de latência e, após reactivação da replicação viral, causa a Zona, que ocorre principalmente em idosos e indivíduos imunocomprometidos.

O diagnóstico serológico é realizado por detecção de anticorpos. A infecção primária deve ser confirmada por cultura viral (não efectuada no laboratório), que constitui o método de referência para o diagnóstico do VZV.

2.6.3 Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um herpesvírus, cuja transmissão dá-se por contacto com fluidos biológicos contaminados (urina, saliva, sangue, fluidos sexuais), ou por transmissão vertical, transfusões sanguíneas ou transplante de órgãos. As infecções primárias são normalmente benignas, assintomáticas ou manifestando um síndrome mononucleósica. Consequências mais graves podem ocorrer em mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos. As consequências da infecção congénita incluem aborto, atraso psicomotor, hepatoesplenomegália, surdez, coriorretinite, microcefalia, entre outros.

O diagnóstico serológico é realizado por detecção de anticorpos. Deve também ser avaliada a avidez de IgG em grávidas.

2.6.4 Mononucleose Infecciosa

O vírus de Epstein-Barr (EBV) é um herpesvírus responsável pela maioria dos casos de mononucleose infecciosa, estando também relacionado com o linfoma de Burkitt e outros síndromes linfoproliferativas. A transmissão ocorre principalmente por via oral, através da saliva. Provoca infecções assintomáticas nas crianças. Em adolescentes e adultos jovens causa dores de garganta, febre, linfadenopatias, fadiga, hepatoesplenomegália e linfocitose (>10% linfócitos atípicos).

O diagnóstico serológico consiste na pesquisa de anticorpos heterófilos e de anticorpos específicos contra proteínas do vírus, nomeadamente o antígeno da cápside (VCA), o antígeno nuclear (EBNA) e o antígeno precoce (EA) (este último não é detectado no laboratório).

2.6.5 Hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV) é um vírus hepatotrópico não citopático, transmitido por via oral-fecal. É a causa mais frequente de hepatite infecciosa, ocorrendo principalmente nas crianças e, na grande maioria dos casos, é uma patologia auto-limitada e assintomática. Quando é sintomática, as manifestações incluem astenia, vômitos, náuseas e icterícia.

O diagnóstico serológico é importante, pois a sintomatologia, quando presente, é semelhante à encontrada nas hepatites B e C.

2.6.6 Hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV) é um vírus hepatotrópico não citopático, transmitido pelas vias sanguínea, sexual, oral e, com menor importância, vertical. Este vírus é capaz de causar infecções agudas assintomáticas ou sintomáticas (icterícia, náuseas, febre ligeira, urina escura e fezes claras), mas também infecções crônicas que podem conduzir a cirrose e a carcinoma hepatocelular.

O diagnóstico laboratorial do HBV baseia-se na avaliação bioquímica da função hepática e, principalmente, na detecção serológica de antígenos virais e de anticorpos assim como do DNA viral (Tabela 2.H e Figuras 2.E e 2.F).

Tabela 2.H – Interpretação dos padrões serológicos.

Ag HBs	Ag HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-Hbe	Anti-HBs	DNA HBV	Interpretação
+	+/-	-	-	-	-	+	Fase de incubação
+	+	+	+	-	-	+	Fase aguda
+	+	-	+	+/-	-	+	Infecção crônica com replicação viral
+	-	-	+	+/-	-	+	Infecção crônica com replicação viral (“mutantes do pré-core”)
+	-	-	+	+/-	-	-	Infecção crônica sem replicação viral
-	-	-	+	+/-	-	-	Período “de janela”
-	-	-	+	+/-	+	-	Imunidade após infecção por HBV
-	-	-	-	-	+	-	Imunidade após vacinação
-	-	-	-	-	-	-	Ausência de contacto com HBV

Ag HBs – antígeno de superfície; **Ag HBe** – antígeno de replicação viral; **DNA viral** – indicador mais sensível da replicação viral activa.

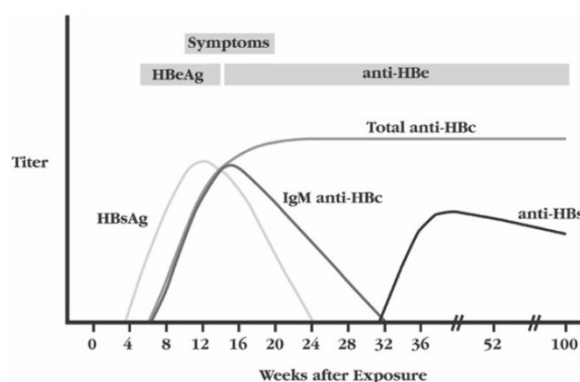


Figura 2.E ⁶ – Padrões serológicos observados durante a infecção aguda por HBV.

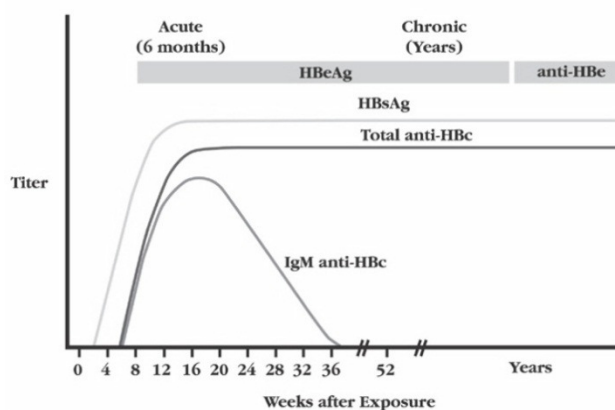


Figura 2.F⁶ – Padrão serológico observado após a progressão da infecção por HBV para infecção crônica.

2.6.7 Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus hepatotrópico não citopático, transmitido principalmente através das vias sanguínea, sexual e vertical, e do contacto com objectos contaminados. É responsável pela maioria das hepatites não-A e não-B. Este vírus tem a capacidade de causar infecções agudas que podem conduzir a infecções crônicas, com maior risco de progressão para cirrose e de carcinoma hepatocelular.

O diagnóstico serológico do HCV consiste na detecção de anticorpos anti-HCV, cuja presença pode indicar que o indivíduo é portador ou se encontra com infecção activa, mas não distingue entre infecção presente e passada, ou aguda e crônica. Outras formas de detecção de HCV são a determinação qualitativa e quantitativa de RNA viral, e a genotipagem (estes testes não são efectuados no laboratório).

2.6.8 HIV

O síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) nos humanos é provocada pelos vírus HIV-1 e HIV-2. São retrovírus transmitidos por via sexual, vertical, e por exposição a sangue ou produtos sanguíneos contaminados. A infecção provocada por este vírus é crônica, uma vez que o hospedeiro é incapaz de eliminar o vírus.

Para o diagnóstico da infecção por HIV são usados métodos serológicos ou indirectos para a detecção de anticorpos anti-HIV no soro ou no plasma, cuja presença é sinónimo de infecção (excepto em bebés com menos de 18 meses) e métodos directos que incluem a detecção das partículas virais (por cultura celular), antígeno viral p24 (proteína core), DNA pró-viral

(genoma viral integrado no genoma da célula) e RNA viral (determinação da carga viral). Para a confirmação do diagnóstico de uma infecção por HIV utiliza-se o método de Western-Blot.

No laboratório, o ensaio utilizado permite a detecção qualitativa simultânea do antígeno p24 (proteína core) do vírus HIV e de anticorpos contra a principal proteína imunogénica deste vírus (proteína transmembranar) em soro ou plasma humanos.

2.6.9 Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário, e um parasita intracelular obrigatório. O seu hospedeiro definitivo é o gato mas é capaz de causar infecções no Homem. A toxoplasmose é contraída pela ingestão de carne infectada (mal cozinhada), oócitos, alimentos e água contaminados com fezes de gato, e por via transplacentária. A infecção contraída por indivíduos saudáveis é geralmente assintomática, podendo em alguns casos ocorrer o desenvolvimento de linfadenopatias. Infecções graves podem ocorrer em indivíduos imunocomprometidos, podendo ser fatais. A infecção primária durante a gravidez pode conduzir a infecção congénita, com manifestações graves que incluem coriorretinite, calcificações intracranianas e hidrocefalia. A maioria das crianças infectadas numa fase avançada da gravidez são assintomáticas à nascença, manifestando sintomas posteriormente.

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose baseia-se na detecção serológica de anticorpos específicos contra este parasita. Esta metodologia interessa particularmente na monitorização da gravidez (Tabela 2.I).

Tabela 2.I – Interpretação dos padrões de serologia.

IgG	IgM	Avidez IgG	Interpretação
Não reactiva	Não reactiva	-	Ausência de infecção Vigilância serológica mensal
Não reactiva	Reactiva	-	Infecção primária Voltar a testar após 2 a 3 semanas
Reactiva	Não reactiva	Elevada	Infecção passada (provavelmente com mais de 4 meses) com imunização
Reactiva	Reactiva	Baixa	Infecção primária ou Reactivação Voltar a testar após 3 semanas
Reactiva	Reactiva	Elevada	Infecção passada (provavelmente com mais de 4 meses)

2.6.10 Rubéola

O vírus da Rubéola é transmitido através de gotículas de saliva ou secreções nasais. A infecção primária é geralmente uma doença ligeira e auto-limitada. A infecção congénita ocorre por transmissão vertical, em praticamente todos os casos de infecção primária materna durante o primeiro trimestre da gravidez, e pode ter efeitos muito graves para o feto, nomeadamente baixo peso à nascença, cataratas, surdez, cegueira, microcefalia, doença cardíaca e atraso mental, que, no seu conjunto, recebem a denominação de Síndrome da Rubéola Congénita.

O diagnóstico serológico é de grande importância pois os sintomas de rubéola são inespecíficos ou ausentes. Outros dados laboratoriais úteis são o isolamento viral e a detecção do seu genoma por RT-PCR (estes testes não são efectuados no laboratório).

2.7 Auto-Imunidade

A noção de auto-imunidade refere-se à resposta do sistema imunitário contra componentes do próprio organismo, mediada por linfócitos T auto-reactivos e autoanticorpos, e capaz de lesar as células e causar várias patologias (Tabela 2.J).

Tabela 2.J – Exemplos de patologias auto-imunes.

Patologia	Auto-Antigénio	Resposta Imunitária
Patologias auto-imunes específicas de órgão		
Doença de Addison	Células da Glândula Supra-Renal	Autoanticorpos
Doença de Graves	Receptores de TSH	
Tiroidite de Hashimoto	Células da tiróide	Autoanticorpos, células T
Diabetes <i>mellitus</i>	Células β do pâncreas	
Anemia perniciosa	Células gástricas e factor íntínseco	Autoanticorpos
<i>Myasthenia gravis</i>	Receptores da acetilcolina	
Patologias auto-imunes sistémicas		
Esclerose Múltipla	Cérebro ou substância branca	Autoanticorpos, células T
Artrite Reumatóide	Tecido conjuntivo	
Lúpus Eritmatoso Sistémico	DNA, proteínas nucleares e membranas das plaquetas e dos eritrócitos	Autoanticorpos, complexos imunes
Síndrome de Sjögren	Glândulas salivares, fígado, rins e tiróide	Autoanticorpos
Cirrose biliar primária	Complexo piruvato desidrogenase	

Nas patologias auto-imunes sistêmicas é frequente a presença de autoanticorpos dirigidos contra componentes do núcleo e do citoplasma (ANA). Na suspeita de uma patologia auto-imune sistêmica, a primeira abordagem de diagnóstico é o despiste de autoanticorpos anti-nucleares.

Tradicionalmente os autoanticorpos anti-nucleares são detectados por Imunofluorescência usando como substrato células HEp-2 (células epiteliais humanas derivadas de um carcinoma da laringe) e analisando os padrões obtidos. Os autoanticorpos são depois identificados por ELISA, Western Blot ou Imunoprecipitação.

No laboratório é realizado um rastreio para ANA no Liaison que consiste na determinação qualitativa colectiva dos autoanticorpos anti-dsDNA (DNA em cadeia dupla), anti-RNP e anti-Sm (ribonucleoproteínas), anti-SS-A (ribonucleoproteína), anti-SS-B (fosfoproteína), anti-Scl-70 (DNA-topoisomerase-I), anti-Jo-1 (tRNA sintetase), anti-CENP (centrómero), e anti-mitocôndrias, em amostras de soro. Um resultado positivo requer a identificação dos autoanticorpos presentes (Capítulo 4.1).

O Síndrome Anti-Fosfolípidos, ou Síndrome de Hughes, é caracterizado por trombozes arteriais ou venosas, ou abortos recorrentes, associados à presença de autoanticorpos anti-cardiolipina. Estes pertencem ao grupo dos autoanticorpos anti-fosfolípidos, grupo que engloba anticorpos com efeito trombogénico.

No laboratório são detectados estes autoanticorpos (IgM e IgG).

3. RADIOIMUNOENSAIO

O radioimunoensaio é uma das técnicas mais sensíveis para a detecção de antígenos e anticorpos.

Baseia-se na competição, entre antígenos marcados com isótopos radioactivos (^{125}I) e antígenos não marcados, pela ligação a uma quantidade conhecida de locais de ligação de anticorpos. A quantidade de antígeno radioactivo ligado é inversamente proporcional à concentração de antígeno não radioactivo presente na amostra. São usadas soluções de concentrações conhecidas (calibradores), progressivamente crescentes, para estabelecer uma curva de calibração, a partir da qual são extrapoladas as concentrações dos antígenos presentes das amostras testadas. É utilizado um contador gamma para a detecção radiométrica em radioimunoensaios (Figura 3.A).



Figura 3.A ² – Contador Gamma.

Na tabela seguinte encontram-se os parâmetros determinados no laboratório por esta técnica, em amostras de soro.

Tabela 3.A – Parâmetros determinados por radioimunoensaio no laboratório de Imunologia.

Parâmetro	Valores de Referência				Unid.	Kit
	Homem	Mulher				
Testosterona livre	20-50 anos	8-55	<50 anos	<3.2	pg/mL	Active Free Testosterone (Beckman Coulter)
	>50 anos	7-25	>50 anos	<1.7		
Aldosterona			4-31		ng/dL	Active Aldosterone (Beckman Coulter)
17-α-Hidroxi progesterona	0.6-3.3		Folicular	0.4-1.2	ng/mL	17-α-hidroxi progesterona (Immunotech)
			Luteínica	1.2-4.3		
			Contraceptivos orais	0.1-1.2		
			Pós-menopausa	0.2-1.4		
Anticorpos anti-receptor da TSH			<1.0		U/L	Tubos revestidos de receptores de TSH (RSR)

Seguidamente é apresentado o fundamento teórico e o interesse clínico da determinação de cada parâmetro referido.

3.1 Testosterona Livre

A maior parte da testosterona circula inactiva, ligada à SHBG (sex hormone-binding globulin), sendo que a restante circula activa ligada à albumina e/ou livre.

Os níveis de testosterona livre têm interesse na suspeita de alterações da SHBG, e encontram-se elevados em mulheres com hiperandrogenismo associado a hirsutismo com ou sem síndrome dos ovários poliquísticos. Os níveis de SHBG encontram-se aumentados em situações de hipertireoidismo, gravidez, uso de contraceptivos orais ou medicamentos antiepilépticos, e diminuídos em situações de hipotireoidismo, excesso de androgénios e obesidade.

3.2 Aldosterona

A aldosterona actua no rim, estimulando o transporte activo nos túbulos contornados distais e colectores para a retenção de sódio, e promovendo a secreção de potássio, hidrogénio e amónia. Actua ainda ao nível do transporte iónico noutros tecidos epiteliais.

Os níveis de aldosterona no plasma variam com a posição do corpo (deitado versus erecto) e com a ingestão de sal, e apresentam variação circadiana com um pico de manhã. Encontram-se aumentados no hiperaldosteronismo primário, ou Síndrome de Conn, que pode ser provocado por adenomas do córtex supra-renal produtores de aldosterona, e no hiperaldosteronismo secundário caracterizado por níveis elevados de renina, que pode ser provocado por tumores produtores de renina, hiponatremia, desidratação e Síndrome de Bartter. Encontram-se diminuídos na hiperplasia adrenal congénita com perda de sal, deficiência de renina, entre outros.

3.3 17- α -Hidroxiprogesterona

A 17- α -hidroxiprogesterona é uma molécula esteróide e é um precursor de cortisol, androstenediona e aldosterona, não sendo conhecida nenhuma outra função fisiológica. Os seus níveis variam de acordo com a variação circadiana do ACTH.

O doseamento desta molécula constitui um dado importante para a detecção e diagnóstico da deficiência de 21-hidroxilase, a causa mais comum de hiperplasia adrenal congénita onde se verifica a acumulação e redireccionamento da 17- α -hidroxiprogesterona para a via de síntese de androgénios (androstenediona e testosterona), resultando na virilização progressiva grave desde a vida fetal ou desde a infância.

3.4 Anticorpos Anti-Receptor da TSH

A TSH é uma glicoproteína sintetizada pela adenohipófise. Liga-se aos seus receptores específicos localizados nas membranas das células da tiróide, activando uma cascata de sinalização celular que culmina na síntese das hormonas tiroideias.

Os anticorpos anti-receptor da TSH ligam-se aos receptores da TSH e exercem um efeito estimulante. A estimulação crónica das células da tiróide leva à hipertrofia da glândula com aumento da vascularização, conduzindo à formação de bócio. Estes anticorpos são detectados na doença de Graves, que constitui a causa mais comum de hipertiroidismo.

4. TÉCNICAS MANUAIS

4.1 Auto-Imunidade

No laboratório, é utilizado o imunoensaio enzimático para a detecção de autoanticorpos específicos.

As técnicas utilizadas usam tiras revestidas com antígenos altamente purificados, dispostos em zonas definidas das tiras. As amostras são colocadas a incubar com as tiras, e os anticorpos, se presentes, ligam-se aos antígenos correspondentes. Os anticorpos em excesso são eliminados e os anticorpos ligados são detectados numa segunda incubação com um conjugado enzimático (fosfatase alcalina ligada a IgG anti-humana) que, na presença de substrato próprio (bromo-cloro-indolilfosfato), catalisa a formação de um pigmento.

4.1.1 Immunoblot Perfil ANA

A técnica **ANA Profile 3 Euroline** (Euroimmun) é utilizada para a detecção qualitativa de autoanticorpos IgG anti-U1-nRNP, anti-Sm, anti-SS-A, anti-Ro-52, anti-SS-B, anti-Scl-70, anti-PM-Scl (complexo de polipéptidos), anti-Jo-1, anti-CENP B, anti-PCNA (antígeno nuclear dependente do ciclo celular), anti-dsDNA, anti-nucleossomas, anti-histonas, anti-proteína-P ribossomal e anti-AMA-M2 (complexo multienzimático mitocondrial), em soro ou plasma (Figura 4.A).

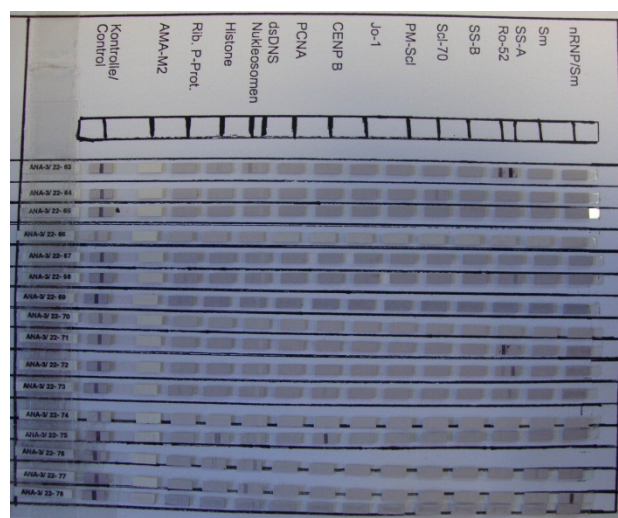


Figura 4.A² – Tiras de teste para a caracterização do perfil ANA.
As riscas escuras localizam a detecção de autoanticorpos.

Como já foi referido, no laboratório esta técnica é utilizada para a confirmação de um resultado positivo obtido no rastreio para ANA efectuado no Liaison.

4.1.2 Immunodot Perfil Mitocôndrias e Nucleossomas+Histonas

A técnica **Mitochondria Profile Dot** (Alphadia) é utilizada para a detecção qualitativa de autoanticorpos IgG e IgM dirigidos contra as subunidades E2 dos complexos α -cetoglutarato desidrogenase (OGDC-E2), α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (BCOADC-E2) e piruvato desidrogenase (PDC-E2), localizadas na membrana interna da mitocôndria (Figura 4.B). Estes autoanticorpos são os principais marcadores serológicos da cirrose biliar primária.

A técnica **Nucleossomes+Histones Profile Dot** (Alphadia) é utilizada para a detecção qualitativa de autoanticorpos IgG dirigidos contra antígenos de nucleossomas e histonas (Figura 4.C). Os autoanticorpos anti-nucleossomas são característicos do Lúpus Eritmatoso Sistémico, assim como os autoanticorpos anti-histonas que também ocorrem em alguns casos de Artrite Reumatóide.

Em ambas as técnicas, a cor roxa reflecte a actividade enzimática, e a intensidade da cor é directamente proporcional à quantidade de anticorpos presente na amostra.

Serum Identification	Dot Position	Positive Control				OGDC 1	BCOADC 2	PDC 3	
		OGDC	BCOADC	PDC	Negative Control				
1	M3D 1	•	•	•	•	+	+	+	✓
2	M3D 2	•	•	•	•	+	+	+	✓
3	M3D 3	•	•	•	•	+	+	+	✓
4	M3D 4	•	•	•	•	+	+	+	✓
5	M3D 5	•	•	•	•	+	+	+	✓
6	M3D 6	•	•	•	•	+	+	+	✓
7	M3D 7	•	•	•	•	+	+	+	✓
8	M3D 8	•	•	•	•	+	+	+	✓
9	M3D 9	•	•	•	•	+	+	+	✓
10	M3D 10	•	•	•	•	+	+	+	✓
11	M3D 11	•	•	•	•	+	+	+	✓
12	M3D 12	•	•	•	•	+	+	+	✓
13	M3D 13	•	•	•	•	+	+	+	✓
14	M3D 14	•	•	•	•	+	+	+	✓
15	M3D 15	•	•	•	•	+	+	+	✓
16	M3D 16	•	•	•	•	+	+	+	✓
17	M3D 17	•	•	•	•	+	+	+	✓
18	M3D 18	•	•	•	•	+	+	+	✓

Figura 4.B² – Tiras de teste para a detecção de anticorpos anti-mitocôndria.

Serum Identification	Dot Position					Nucleosome 1	Histones 2	
		Positive Control	Nucleosome	Histones	Negative Control			
1	NUHISD 1	●	●	●	●	+/	-	✓
2	NUHISD 2	●	●	●	●	-	-	✓
3	NUHISD 3	●	●	●	●	-	-	✓
4	NUHISD 4	●	●	●	●	-	-	✓
5	NUHISD 5	●	●	●	●	-	-	✓
6	NUHISD 6	●	●	●	●	-	-	✓
7	NUHISD 7	●	●	●	●	-	-	✓
8	NUHISD 8	●	●	●	●	-	-	✓
9	NUHISD 9	●	●	●	●	-	-	✓
10	NUHISD 14	●	●	●	●	-	-	✓
11	NUHISD 15	●	●	●	●	-	-	✓
12	NUHISD 16	●	●	●	●	-	-	✓
13	NUHISD 17	●	●	●	●	-	-	✓
14	NUHISD	⊖	⊖	⊖	⊖			

Figura 4.C² – Tiras de teste para a detecção de anticorpos anti-nucleossomas e anti-histonas.

4.1.3 Teste de Waaler-Rose

O teste de **Waalser-Rose** (bioMérieux) consiste numa reacção de aglutinação em carta, que utiliza eritrócitos de carneiro sensibilizados com γ -globulinas de coelho anti-eritrócitos de carneiro. Na presença de factores reumatóides, estes eritrócitos sofrem aglutinação (Figura 4.D). Em caso de reacção positiva, é aconselhada a quantificação destes anticorpos (não efectuada no laboratório).

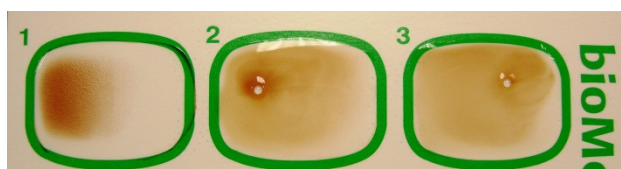


Figura 4.D² – Carta de teste Waaler-Rose.

1 – Controlo positivo (soro positivo + eritrócitos sensibilizados); **2** – Resultado negativo (amostra (neste caso negativa) + eritrócitos sensibilizados); **3** – Controlo negativo (amostra + eritrócitos testemunho).

A detecção dos factores reumatóides é importante para o diagnóstico da artrite reumatóide, apesar de não serem específicos desta patologia. São tipicamente anticorpos IgM reactivos contra a porção Fc de anticorpos IgG. A ligação IgM-IgG leva à formação de complexos imunes que se depositam nas articulações e que activam o sistema do complemento, levando a inflamação crónica das articulações.

4.2 Diagnóstico Serológico de Infecções

4.2.1 *Chlamydia* spp.

O género *Chlamydia* inclui 4 espécies e engloba microrganismos Gram-negativos intracelulares obrigatórios. *Chlamydia trachomatis* transmite-se por via sexual, e encontra-se com elevada frequência. Causa infecções no tracto urogenital e nos olhos, na maioria dos casos, assintomáticas. Nos recém-nascidos é capaz de provocar conjuntivite e/ou pneumonia neonatal. *Chlamydia pneumoniae* causa infecções no tracto respiratório. *Chlamydia psittaci* infecta aves e mamíferos com possível transmissão aos humanos e com elevada taxa de mortalidade. *Chlamydia pecorum* não foi ainda encontrada em infecções em humanos.

No laboratório são usados os kits **Medac Chlamydien-IgA/IgM/IgG-rELISA** que consistem em ensaios imunoenzimáticos para a detecção quantitativa de anticorpos IgA, IgM e IgG específicos para os lipopolissacáridos do género *Chlamydia*, em soro. Utilizam um antígeno de estrutura molecular definida que consiste num fragmento de lipopolissacárido comum a todas as espécies. A detecção dos anticorpos é realizada através de anticorpos anti-imunoglobulinas humanas (IgA, IgM e IgG, respectivamente) conjugados à enzima peroxidase, aos quais é adicionado o substrato da enzima. A absorção é lida fotometricamente e são calculados os títulos dos anticorpos.

A presença de IgM indica uma infecção activa. A presença de IgA indica uma infecção num estado muito inicial. A presença de IgG sem IgM indica uma infecção passada, e associada à presença de IgA indica uma infecção activa.

4.2.2 *Treponema pallidum*

Treponema pallidum é o agente etiológico da sífilis, uma doença sexualmente transmissível. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas ulceradas, localizadas na região genital e, com menor frequência, nas regiões intrarectal, perianal ou oral. Pode ocorrer infecção congénita com consequências graves que incluem o aborto, nados mortos, ou sintomatologia após o nascimento.

Este microrganismo não se multiplica em meios de cultura artificiais, logo o diagnóstico laboratorial consiste na detecção de anticorpos inespecíficos (reaginas) e específicos.

No laboratório é usado o kit **RPR-nosticon II** (bioMérieux) que consiste num teste não treponemal de floculação em lâmina para a determinação qualitativa ou semi-quantitativa de reaginas em soro. As reaginas são anticorpos IgM e IgG desenvolvidos contra o complexo cardiolipina-colesterol-lecitina deste microrganismo (substâncias usadas como base para desenvolvimento do reagente clássico (antigénio VDRL (Venereal Disease Research Laboratory))). O reagente, na presença das reaginas, sofre aglutinação, formando-se flóculos pretos visíveis macroscopicamente (Figura 4.E).

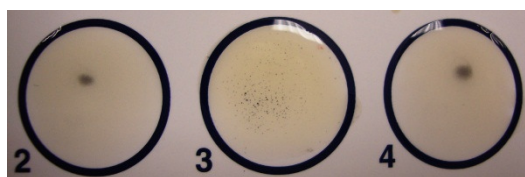


Figura 4.E² – Carta de teste RPR-nosticon II.
2 e 4 – Amostras negativas; 3 – Amostra positiva.

É também usado o kit **TPHA Tests** que consiste num teste treponemal de hemaglutinação passiva para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos treponemais em soro. Utiliza eritrócitos revestidos com antígenos de *Treponema pallidum* que, na presença de anticorpos específicos, sofrem aglutinação e não se depositam (Figura 4.F).

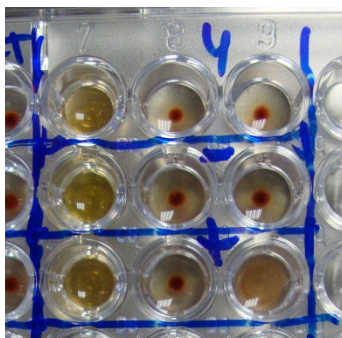


Figura 4.F² – Dispositivo de teste TPHA.
4 – Amostra negativa; Neg – Controlo negativo; Pos – Controlo Positivo.

4.2.3 Equinococose

A equinococose humana ou hidatidose é causada pelas formas larvares de céstodes do género *Echinococcus*.

Echinococcus granulosus causa a equinococose cística e é a forma mais comum. Os seus hospedeiros definitivos são cães e outros canídeos, e os hospedeiros intermediários são

carneiros, cabras, porcos, vacas, cavalos, entre outros. Os humanos ficam infectados por ingestão de ovos que libertam oncosferas no intestino. Estas migram para vários órgãos e causam o desenvolvimento de quistos. A infecção pode manter-se silenciosa durante vários anos até os quistos começaram a crescer, causando a manifestação de diversos sintomas (dependendo dos órgãos afectados).

No laboratório é usado o kit **Echinococcus Fumouze** que consiste num teste de hemaglutinação indirecta para a detecção quantitativa de anticorpos anti-*Echinococcus granulosus* em soro. Utiliza eritrócitos sensibilizados com antígenos deste parasita que, na presença de anticorpos, sofrem aglutinação e não se depositam.

4.2.4 Doenças Febris

No laboratório, é utilizado um conjunto de antígenos **Febrile Antigens** (Becton, Dickinson and Company) que inclui os antígenos de *Brucella abortus* e *Proteus* OX19, e os antígenos flagelares (H) e somáticos (O) de *Salmonella typhi*, para a realização de testes de aglutinação qualitativos e semi-quantitativos. Tem como objectivo detectar, em amostras de soro, anticorpos (aglutininas) produzidos em algumas doenças infecciosas caracterizadas por febre persistente como a salmonelose, brucelose e rickettsiose. São executados em lâmina (confirmação de resultados positivos em tubo) e constituem aplicações serológicas da reacção de Widal (reacção de aglutinação para a detecção de febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*) e das reacções Weil-Felix (reacção de aglutinação para a detecção de febres exantémicas provocadas por agentes da família Rickettsiaceae).

As aglutininas em contacto com os antígenos homólogos, sob condições controladas, são capazes de provocar aglutinação visível. O grau de aglutinação depende da concentração de antígeno, título de anticorpos presente, composição da solução e temperatura. A aglutinação pode ocorrer em amostras de indivíduos saudáveis, como resultado de imunização prévia, infecção passada, ou presença de anticorpos contra antígenos semelhantes. Nestes casos os títulos deverão ser baixos e manter-se constantes. Os títulos resultantes de infecção activa ou imunização recente por microrganismos com antígenos homólogos deverão ser elevados e com tendência para aumentar (em amostras obtidas posteriormente).

É também utilizado o teste de aglutinação em carta **Brucelloslide-Test** (bioMérieux) em amostras de soro, que auxilia no diagnóstico da brucelose aguda. É um teste baseado no

princípio da prova ao antígeno tamponado, isto é, na presença de aglutininas específicas da brucelose, o antígeno ácido tamponado, corado com o corante vital Rosa Bengala, sofre aglutinação.

4.3 Imunocromatografia

Os testes de imunocromatografia utilizados no laboratório são imunoensaios rápidos de dois locais em membrana.

4.3.1 Mononucleose Infecciosa

É utilizado o teste rápido **MNI** (Iberkit) que consiste num ensaio qualitativo rápido para a detecção de anticorpos humanos heterófilos IgM produzidos contra o vírus Epstein-Barr, em amostras de soro. Utiliza uma combinação de corante conjugado anti-IgM e eritrócitos de cavalo fixos numa membrana. Os anticorpos heterófilos presentes na amostra formam um complexo antígeno-anticorpo com o conjugado, e estes complexos ligam-se ao extracto de eritrócitos na zona-teste da membrana, originando uma banda cor-de-rosa. O conjugado não ligado liga-se aos reagentes da zona-controlo da membrana, originando uma banda cor-de-rosa que valida o teste (Figura 4.G).



Figura 4.G² – Dispositivo de teste MNI (resultado negativo, teste validado).

4.3.2 Teste de Gravidez

A gonadotropina coriónica humana (hCG) é uma hormona secretada durante a gravidez e a sua concentração aumenta rapidamente, o que a torna um bom marcador para a detecção precoce e confirmação da gravidez.

O teste de gravidez **Beta-Clear hCG** (Core Diagnostics) é um imunoensaio rápido para a detecção da hCG, em amostras de urina ou soro. Conforme a amostra flui através da membrana, o conjugado de ouro coloidal anti-hCG corado forma um complexo antígeno-

anticorpo com as moléculas de hCG presentes na amostra. Este complexo migra ao longo da membrana e, na zona-teste, é imobilizado pelos anticorpos anti-hCG que a cobrem, formando uma banda cor-de-rosa (teste positivo). A ausência de cor nesta zona indica ausência de hCG. O conjugado não ligado continua a migrar e liga-se aos anticorpos anti-rato que cobrem a zona-controlo, formando uma banda cor-de-rosa que valida o teste (Figura 4.H).



Figura 4.H² – Dispositivo de teste Beta-Clear hCG (resultado positivo, teste validado).

5. PROTEÍNAS

As proteínas são as moléculas mais abundantes das células, e participam na maior parte dos processos que nelas ocorrem. As imunoglobulinas, por sua vez, são proteínas globulares solúveis sintetizadas por plasmócitos. Têm como funções o reconhecimento, ligação e eliminação dos antígenos que estimularam a sua produção. São constituídas por 4 cadeias polipeptídicas, isto é, 2 cadeias pesadas de um tipo (G, A, M, D ou E) e 2 cadeias leves de um tipo (κ ou λ). A cadeia pesada define a classe a que a imunoglobulina pertence, e as cadeias leves são comuns a todas as classes de imunoglobulinas.

5.1 Electroforese das Proteínas

O termo electroforese refere-se à migração de partículas carregadas, quando sujeitas a um campo eléctrico. A heterogeneidade de cargas das proteínas do soro, líquido cefalorraquidiano e urina permite a sua separação em fracções clinicamente relevantes.

As proteínas são constituídas por unidades estruturais que são os aminoácidos. Estes possuem um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$) (ácido), um grupo amina ($-\text{NH}_2$) (básico), e um grupo R cuja sequência é específica de cada aminoácido (neutro, ácido ou básico) (Figura 5.A).

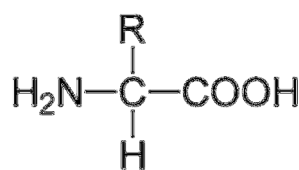


Figura 5.A ⁷ – Estrutura geral de um aminoácido.

A carga de cada aminoácido depende do seu grupo R e do pH da solução em que se encontra, definindo a sua migração em electroforese. Por sua vez, cada proteína apresenta uma carga (dependendo da sua conformação e modificações pós-traducionais) e um padrão de migração electroforética específicos sob condições definidas de pH.

5.1.1 Aplicações Clínicas da Electroforese

No laboratório é realizada a electroforese das proteínas do soro no aparelho semi-automático multi-paramétrico Hydrasys, através do kit **Hydragel 54 Protein**, que proporciona a separação em meio alcalino (pH 9.2) das proteínas do soro em 5 fracções principais, em gel de agarose. As proteínas separadas são coradas com negro de amido.



Figura 5.B ² – Hydrasys.

As electroforeses resultantes são analisadas visualmente para determinar alterações do perfil e avaliadas por densitometria num scanner, o que dá uma quantificação relativa e precisa de cada zona individual. Face ao valor de proteinémia total, são determinados os valores absolutos de cada fracção em g/dL (Tabela 5.A).

Tabela 5.A – Valores de referência das 5 fracções de proteínas do soro.

Fracção	Valores de Referência	
	%	g/dL
Albumina	59,8-72,4	3,83-6,18
α_1	1,0-3,2	0,06-0,26
α_2	7,4-12,6	0,47-1,03
β	7,5-12,9	0,48-1,05
γ	8,0-15,8	0,51-1,29

As proteínas são assim separadas em 5 fracções com mobilidades distintas: albumina e α_1 -, α_2 -, β - e γ -globulinas. Em amostras frescas é possível separar a fracção β em β_1 e β_2 . Obtém-se um electroforetograma, e cada fracção contém várias proteínas (Figura 5.C).

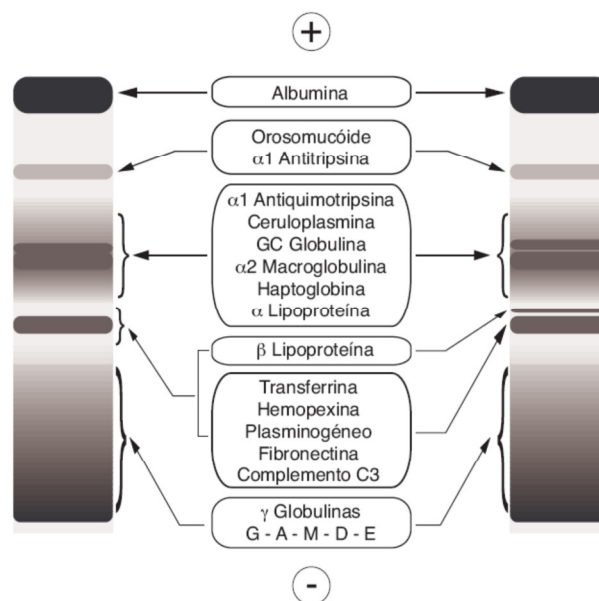


Figura 5.C⁸ – Perfil electroforético normal das proteínas do soro.

A interpretação dos resultados obtidos no electroforetograma requer o conhecimento das variações fisiopatológicas destas proteínas e tem de ser complementado com a determinação da concentração das proteínas totais do soro.

O valor de proteínas totais do soro é determinado no laboratório de Bioquímica. O intervalo fisiológico nos adultos é 6.0-8.0 g/dL, acrescido de 0.3 g/dL no plasma (devido ao fibrinogénio e proteínas da coagulação). Em crianças o intervalo é 4.0-6.0 g/dL. Variações destes valores resultam de alterações do volume sanguíneo e da síntese/excreção proteica (hemoconcentração ou hemodiluição, hiperproteinémia ou hipoproteinémia).

Um perfil electroforético anormal pode apresentar bandas de intensidade aumentada ou diminuída, com mobilidade alterada, ou ausentes. Perfis sugestivos são auxiliares de diagnóstico e prognóstico, e permitem a monitorização da terapêutica (Figura 5.D).

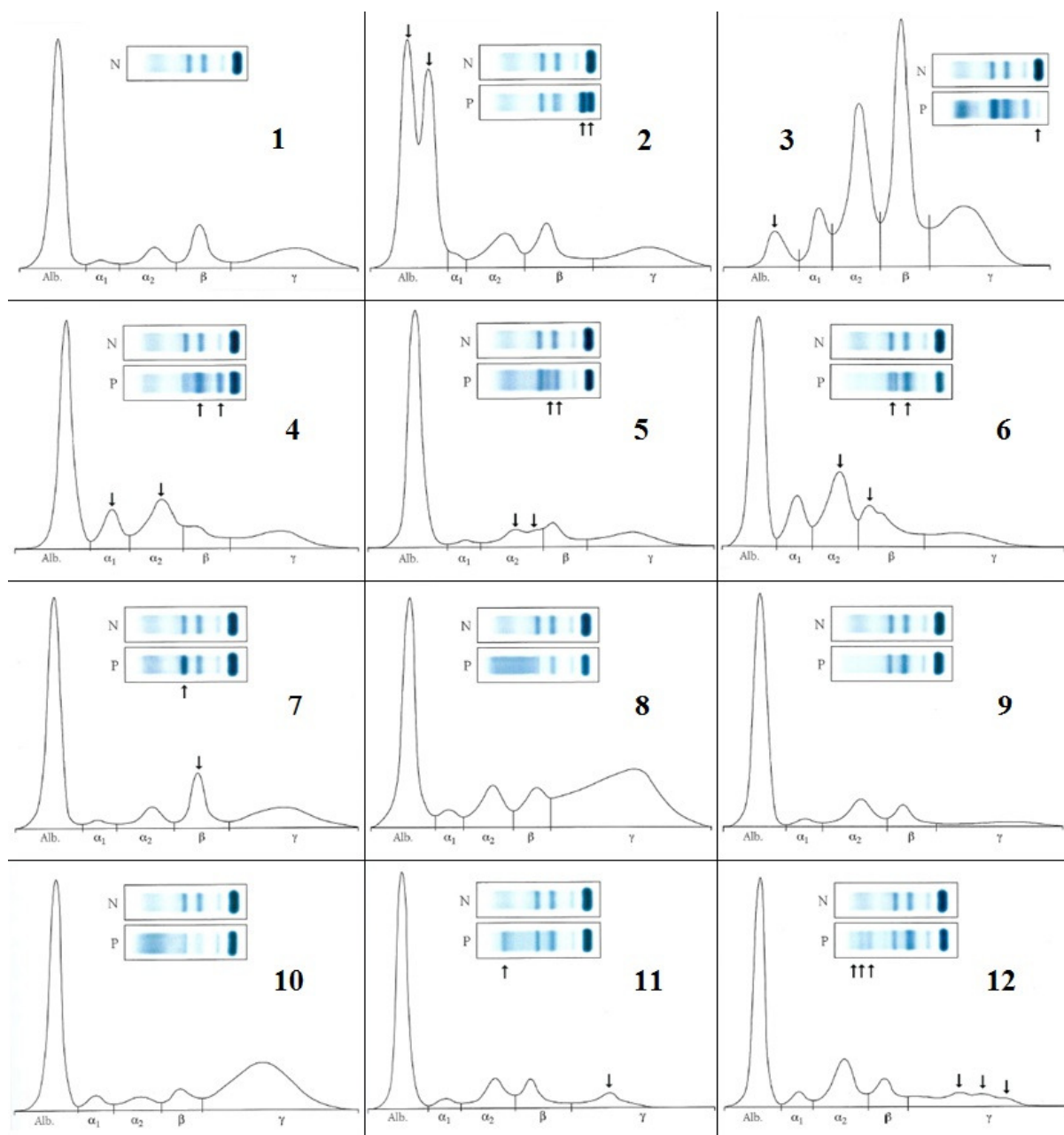


Figura 5.D⁹ – Perfis electroforéticos.

N – soro normal; P – soro patológico;

- 1) Normal; 2) Bisalbuminemia; 3) Analbuminemia congênita;
 4) Síndrome inflamatório agudo; 5) Soro hemolisado; 6) Síndrome nefrótico;
 7) Hipertransferrinemia; 8) Cirrose alcoólica; 9) Hipogamaglobulinemia;
 10) Padrão policlonal; 11) Componente monoclonal; 12) Padrão oligoclonal.

5.2 Imunofixação das Imunoglobulinas

A electroforese das proteínas do soro permite a detecção de imunoglobulinas monoclonais, marcadores das gamopatias monoclonais, que se manifestam sob a forma de bandas anormais encontradas essencialmente nas fracções β - e γ -globulinas (Figura 5.E).

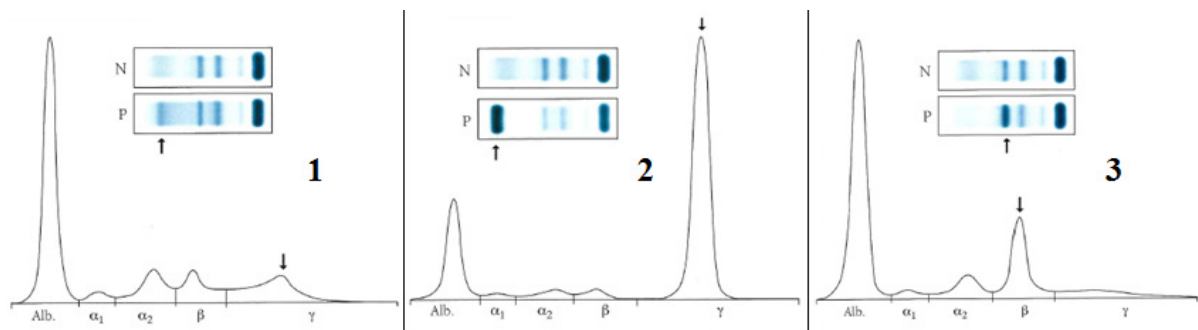


Figura 5.E⁹ – Gamopatias monoclonais com componente nas regiões γ (1 e 2) e β (3).

A imunofixação permite a identificação destas bandas monoclonais através da aplicação de antisoros monoespecíficos.

No laboratório, a imunofixação é realizada em amostras de soro no aparelho Hydrasis, através dos kits **Hydragel 2/4 IF**.

A técnica consiste nas seguintes etapas:

- As proteínas são separadas por electroforese em meio alcalino (pH 9.1), em gel de agarose (amostra aplicada em 6 pistas separadas);
- As proteínas separadas são fixadas e imunoprecipitadas. O fixador precipita todas as proteínas na pista de referência, mostrando o perfil electroforético das proteínas da amostra, e nas restantes 5 pistas são aplicados os antisoros específicos anti-cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM), e anti-cadeias leves (livres e ligadas) κ e λ , que vão precipitar os antígenos correspondentes, permitindo a caracterização das bandas monoclonais obtidas;
- As proteínas não precipitadas são removidas do gel, enquanto que as proteínas precipitadas ficam retidas na matriz do gel, sendo depois coradas com violeta ácido;
- A posição das bandas obtidas no perfil electroforético da amostra na primeira pista é comparada com a posição das bandas anormais obtidas nas restantes pistas, permitindo assim a sua identificação (Figura 5.F).

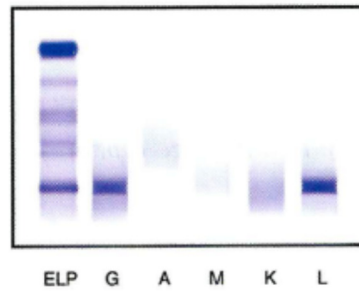


Figura 5.F⁹ – Imunofixação (neste caso trata-se de uma gamapatia monoclonal IgG λ).
ELP – pista de referência; G – IgG; A – IgA; M – IgM; K – kappa; L – lambda.

5.2.1 Interpretação dos Resultados

Uma amostra de soro normal apresenta, na fracção γ -globulinas, uma zona corada difusa constituída por imunoglobulinas policlonais. Uma hipergamaglobulinémia é caracterizada por uma zona difusa fortemente corada, sem bandas estreitas. Uma gamapatia oligoclonal caracteriza-se pela presença de múltiplas bandas de um ou mais tipos de cadeias pesadas e por um ou dois tipos de cadeias leves.

A presença de uma imunoglobulina monoclonal manifesta-se através da presença de uma banda estreita detectada com um dos antisoros anti-cadeias pesadas (γ , α ou μ) e com um dos antisoros anti-cadeias leves (k ou λ). A banda monoclonal detectada, geralmente estreita e bem visível, deve estar localizada ao mesmo nível de migração que a banda anormal presente na pista de referência.

A ausência de reacção com qualquer um dos antisoros anti-cadeias pesadas, na presença de reacção com um dos antisoros anti-cadeias leves pode indicar a presença de uma cadeia leve livre, que deve ser confirmada com o antisoro anti-cadeias leves livres (k livre e λ livre). Pode ainda levantar a suspeita da presença de uma gamapatia a IgD ou IgE (muito raras), que deve ser confirmada com o antisoro anti-cadeias pesadas δ (IgD) e ϵ (IgE).

A ausência de reacção com qualquer um dos antisoros anti-cadeias leves, na presença de reacção com um dos antisoros anti-cadeias pesadas, pode indicar uma gamapatia de cadeias pesadas (γ , α ou μ), muito rara.

Em casos raros, ocorre a proliferação de vários clones de células B, observando-se a presença de várias bandas monoclonais na imunofixação. Uma gamapatia biclonal caracteriza-se pela presença de duas cadeias pesadas (idênticas ou diferentes) e de duas cadeias leves (idênticas ou diferentes).

A presença de várias bandas sobre uma mesma cadeia pesada e uma mesma cadeia leve observa-se quando ocorre a polimerização das imunoglobulinas. Nesta situação, para confirmar a presença de uma anomalia monoclonal, é necessário despolimerizar a amostra usando β -mercaptoetanol e repetir a técnica.

Quando é observada uma banda monoclonal no perfil electroforético das proteínas da amostra (na pista de referência) mas que não é confirmada pelos antisoros, deve-se suspeitar da presença de fibrinogénio (amostra de plasma).

Quando é observada uma banda monoclonal em todas as pistas da imunofixação e ao mesmo nível, deve-se suspeitar da presença de uma crioglobulina ou de uma IgM polimerizada, sendo necessário despolimerizar com um agente redutor e repetir a técnica.

Em determinados casos de gamapatia a IgA, o antisoro anti-cadeia leve pode apresentar uma leve afinidade com a imunoglobulina monoclonal, dificultando a sua detecção. É aconselhada a realização da imunofixação com o programa Bence-Jones no qual a reacção é aumentada através de uma maior duração da incubação com o antisoro.

5.3 Pesquisa de Proteínas de Bence-Jones

As proteínas de Bence-Jones são cadeias leves livres monoclonais (κ ou λ) sintetizadas em excesso e secretadas por um clone de células B no plasma, mas rapidamente excretadas para a urina, havendo maior probabilidade de serem detectadas na urina do que no soro.

No laboratório, é realizada a detecção qualitativa e a identificação das proteínas de Bence-Jones em amostras de urina de 24h, por imunofixação no aparelho Hydrasis, através dos kits **Hydragel 2/4 Bence-Jones**.

A técnica é semelhante à descrita para a imunofixação, à excepção dos antisoros, pois utiliza um antisoro trivalente anti-cadeias pesadas γ , α e μ , antisoros anti-cadeias leves (livres e ligadas) κ e λ , e antisoros anti-cadeias leves livres κ e λ .

5.3.1 Interpretação dos Resultados

A presença de uma proteína de Bence-Jones na urina manifesta-se através de uma banda monoclonal detectada com um dos antisoros anti-cadeias leves (livres e ligadas) κ ou λ , uma

banda monoclonal ao mesmo nível de migração da anterior, detectada com o antisoro anti-cadeias leves livres correspondente, e pela ausência de banda na pista do antisoro trivalente.

A presença de uma paraproteína sérica (não associada a Bence-Jones) eliminada na urina é caracterizada por uma banda monoclonal detectada com o antisoro trivalente, uma banda monoclonal ao mesmo nível de migração da anterior, detectada com um dos antisoros anti-cadeias leves (livres e ligadas) κ ou λ , e pela ausência de banda na pista do antisoro anti-cadeias leves livres correspondente.

A presença de uma paraproteína sérica (associada a Bence-Jones) eliminada na urina é caracterizada pela presença de uma banda monoclonal detectada com o antisoro trivalente, duas bandas detectadas com um ou ambos dos antisoros anti-cadeias leves (livre e ligada) κ ou λ , e uma banda detectada por um dos antisoros anti-cadeia leve livre κ ou λ (esta última banda geralmente não migra ao mesmo nível da fracção detectada com o antisoro trivalente).

A presença de uma proteína de Bence-Jones em diferentes estados de polimerização é caracterizada pela ausência de reacção com o antisoro trivalente, pela presença de várias bandas detectadas com um dos antisoros anti-cadeias leves (livre e ligada) κ ou λ , e pela presença de bandas ao mesmo nível de migração das anteriores, detectadas com o antisoro anti-cadeia leve livre correspondente.

5.4 Gamopatias Monoclonais

As imunoglobulinas encontram-se nas fracções β - e γ -globulinas que, no indivíduo adulto, contêm 70-75% de IgG, 10-15% de IgA, 5-10% de IgM e <1% de IgD e IgE.

Numa situação normal, a fracção γ -globulinas é caracterizada por uma banda larga e difusa, ligeiramente mais intensa na região central. Pode sofrer aumento (hipergamaglobulinémia) ou diminuição (hipogamaglobulinémia).

O aparecimento de uma banda monoclonal, essencialmente nas fracções β - e γ -globulinas, resulta da síntese de uma população homogénea de anticorpos (numa situação normal, a resposta a antígenos inclui a formação de uma população heterogénea de células e anticorpos, que resulta num aumento policlonal ou oligoclonal das imunoglobulinas) que, quando controlada, conduz a gamopatias monoclonais benignas (como um processo inflamatório) ou a gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS). Exemplos de situações malignas são o Mieloma Múltiplo e a Macroglobulinémia de Waldenström.

5.4.1 Interpretação de um Componente Monoclonal

- 1) Conhecer a idade e história clínica, assim como alguns parâmetros:
 - Hemoglobina – baixa, pois uma gamapatia monoclonal é, geralmente, acompanhada de anemia;
 - Velocidade de sedimentação – aumentada, pois o excesso de imunoglobulinas provoca a formação de rouleaux de eritrócitos;
 - Cálcio – aumentado;
 - Proteína C Reactiva – aumentada;
- 2) Determinar o valor de proteínas totais no soro;
- 3) Identificar a banda monoclonal (detectada por electroforese) por imunofixação;
- 4) Dosear, no soro, as cadeias pesadas γ , α e μ , e as cadeias leves (livres e ligadas) k e λ , comparando os valores com as bandas observadas na imunofixação;
- 5) Calcular a relação k/λ ;
- 6) Dosear a proteinúria – considerada sobre o volume da amostra de urina de 24h (valores normais <0.15 mg/24h);
- 7) Dosear, na urina, as cadeias leves (se proteinúria >0.15 mg/24h e se razão k/λ elevada);
- 8) Pesquisar, na urina, proteínas de Bence-Jones por imunofixação (se forem detectadas cadeias leves na urina).

Tabela 5.B – Valores de referência das cadeias pesadas no soro e das cadeias leves no soro e na urina.

Cadeias		Valores de Referência
Pesadas (soro)	γ	7.0-16.0 g/L
	α	0.7-4.0 g/L
	μ	0.4-2.3 g/L
Leves (soro)	k	1.7-3.7 g/L
	λ	0.9-2.1 g/L
	k/λ	1.5-2.5
Leves (urina de 24h)	k	<8.5 mg/L
	λ	<4.7 mg/L

5.4.2 Exemplo

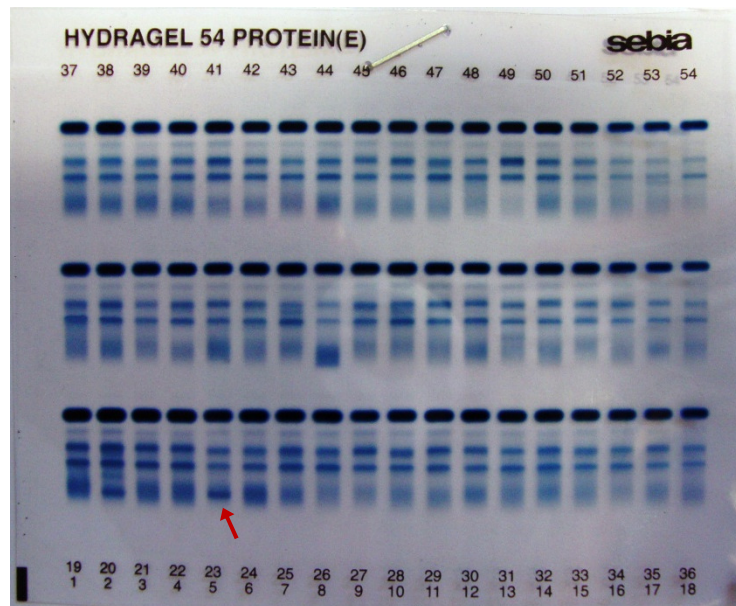


Figura 5.G² – Resultado da electroforese das proteínas de 54 amostras, com banda monoclonal na amostra 5 (**seta**) (correspondente a um homem de 71 anos sem história clínica prévia de gamapatia monoclonal).

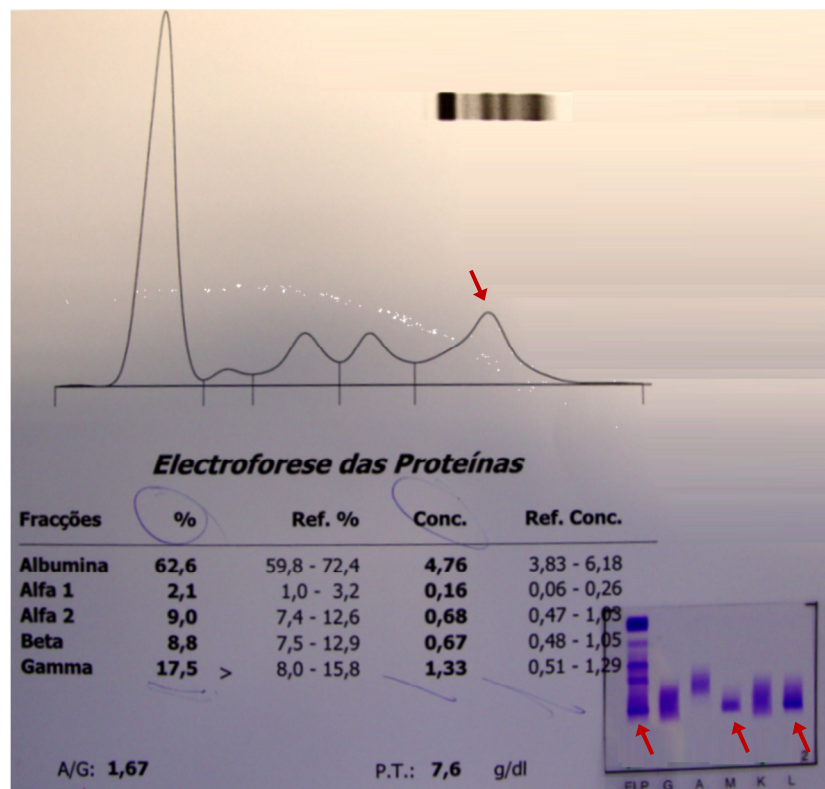


Figura 5.H² – Perfil electroforético da amostra referida anteriormente, com pico na fracção γ -globulinas. Imunofixação da mesma amostra, evidenciando bandas nas pistas M (IgM) e L (λ) (**setas**), ou seja, trata-se de uma gamapatia monoclonal IgM λ . O doseamento no soro da cadeia pesada μ revelou um aumento, assim como da cadeia leve λ . Como a proteinúria foi >0.15 mg/24h, procedeu-se ao doseamento das cadeias leves na urina, mas o resultado foi negativo.

6. HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma metaloproteína cuja principal função é ligar-se (de forma reversível) ao O₂ e transportá-lo dos pulmões para os tecidos, participando também no transporte de cerca de 10% do CO₂ dos tecidos para os pulmões.

A molécula de hemoglobina é um tetrâmero constituído por 2 pares de subunidades diferentes, as globinas (iguais 2 a 2) e 4 grupos heme (cada um constituído por um complexo de protoporfirina e ferro) aos quais se liga o oxigénio. Existem vários tipos de hemoglobina, determinados pelas cadeias de globina que possuem, e que vão variando ao longo do desenvolvimento do ser humano (Tabela 6.A).

Tabela 6.A – Tipos de hemoglobina por período de desenvolvimento.

Período de Desenvolvimento	Hemoglobina	
Embrionário	Hb Gower 1	$\zeta 2\epsilon 2$
	Hb Gower 2	$\alpha 2\epsilon 2$
	Hb Portland 1	$\zeta 2\gamma 2$
Fetal	Hb Fetal	$\alpha 2\gamma 2$
Adulto	HbA	$\alpha 2\beta 2$
	HbA ₂	$\alpha 2\delta 2$
	Hb Fetal	$\alpha 2\gamma 2$

No adulto os valores de referência para a HbA são 14-18 g/dL no homem e 12-16 g/dL na mulher. A HbA₂ e a HbF correspondem, respectivamente, a cerca de 2.5% e 1% da hemoglobina total do adulto.

6.1 Electroforese das Hemoglobinas

No laboratório, é realizada a electroforese das hemoglobinas no aparelho Hydrasis, através do kit **Hydragel 15 Hemoglobin**, que permite a separação, em meio alcalino (pH 8.5), das hemoglobinas normais (HbA e HbA₂) e a detecção das principais hemoglobinas anómalas (HbS ou HbD e HbC ou HbE), em gel de agarose. A electroforese é realizada em amostras de sangue total com EDTA, após lise e lavagem dos eritrócitos. As hemoglobinas separadas são coradas com uma solução de negro de amido.

As electroforeses resultantes são analisadas visualmente e avaliadas por densitometria num scanner, o que dá uma quantificação relativa e precisa das hemoglobinas com interesse particular.

A estrutura espacial da hemoglobina depende da natureza e sequência dos aminoácidos que constituem as globinas. Mutações nos aminoácidos levam à formação de formas variantes de hemoglobina, que apresentam cargas superficiais diferentes e, conseqüentemente, diferentes mobilidades electroforéticas (Figura 6.A).

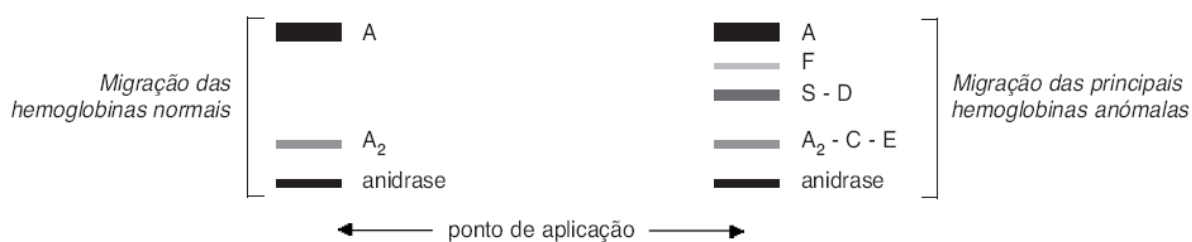


Figura 6.A¹⁰ – Mobilidade electroforética de cada tipo de hemoglobina.

São referidos alguns exemplos de variantes de hemoglobina no Capítulo 5.3 de Hematologia.

HEMATOLOGIA

1. INTRODUÇÃO

No laboratório de Hematologia são utilizados sistemas automatizados para a determinação dos valores do hemograma, velocidade de sedimentação globular e um conjunto de parâmetros relacionados com a hemostase. São também utilizadas técnicas manuais como a coloração de esfregaços de sangue e a sua observação ao microscópio, para a confirmação dos resultados obtidos no contador hematológico assim como para a detecção de alterações hematológicas.

O estágio em Hematologia foi coordenado pela Dr^a Maria Edite Ribeiro e decorreu no período de 1 de Junho a 15 de Julho (232h).

2. PRODUTO BIOLÓGICO

As amostras de sangue são geralmente obtidas por punção venosa que, em adultos, é realizada preferencialmente na região antecubital, nas veias cubital mediana e cefálica, ou ainda na veia basílica. Outros locais possíveis incluem as veias dos pulsos, e do dorso das mãos ou dos pés. Em crianças, recorre-se à veia jugular ou às veias dos pés, e nos recém-nascidos recorre-se à veia fontanela. Esta técnica permite obter um grande volume de sangue, de forma rápida e pouco associada a erros.

O procedimento de colheita para uma punção venosa na região antecubital é o seguinte:

- Aplicar o garrote, acima da zona de punção;
- Pedir ao indivíduo para fechar e abrir a mão algumas vezes;
- Palpar a zona de punção, para procurar a veia adequada;
- Desinfectar o local onde se vai fazer a punção (álcool etílico ou isopropílico a 70°) e deixar secar;
- Colocar as luvas;
- Inserir a agulha na veia, fazendo um ângulo de cerca de 15° com a pele;
- Proceder à extracção do sangue, puxando suavemente o êmbolo da seringa;
- Soltar o garrote (que não deve permanecer mais de 2 min);
- Retirar a agulha e pressionar o local com uma compressa de gaze;
- Pedir ao doente para abrir a mão e continuar a pressionar o local de punção com a gaze até estancar a hemorragia;
- Colocar um penso.

Outra forma de obter uma amostra de sangue é por punção capilar. Esta técnica é utilizada em recém-nascidos, bebés com menos de dois anos, adultos com veias difíceis, idosos com veias frágeis e indivíduos obesos ou queimados, quando não é possível a punção venosa. É realizada no lóbulo da orelha, polpa do dedo da mão, calcanhar ou dedo grande do pé.

O procedimento de colheita para uma punção capilar é o seguinte:

- Aquecer a zona da punção;
- Desinfectar a área (álcool etílico ou isopropílico a 70°) e deixar secar;
- Com a lanceta, realizar a uma punção com 2-3 mm de profundidade;

- Limpar a primeira gota de sangue com gaze estéril, isto é, eliminar a primeira gota;
- Se necessário, espremer delicadamente para favorecer a saída de sangue;
- Colher o sangue directamente em tubos capilares adaptados à tampa de microcontentores ou em micropipeta para dispensar imediatamente no diluente.

As amostras provenientes do centro clínico de ambulatório e dos postos clínicos são transportadas até ao laboratório em posição vertical em suportes apropriados, e separadas das requisições (para evitar contaminações). O transporte deve ser efectuado o mais rápido possível, à temperatura ambiente. A conservação destas amostras deverá ser efectuada a uma temperatura de 4°C.

Caso seja necessário obter uma amostra de sangue fetal ou de células estaminais, procede-se à punção do cordão umbilical. Trata-se de um procedimento médico.

2.1 Anticoagulantes

Para as amostras de sangue total são usados anticoagulantes, isto é, substâncias que inibem a coagulação do sangue. Pretende-se que o anticoagulante impeça a coagulação do sangue total, não altere o tamanho dos eritrócitos e a morfologia dos leucócitos, não provoque hemólise, evite a agregação plaquetária e permita o máximo tempo de conservação da amostra (normalmente até 24h após a colheita a 4°C). É importante que a proporção entre os volumes de sangue e anticoagulante seja respeitada.

Os anticoagulantes utilizados no laboratório são:

- **EDTA** (ácido etilenodiaminotetracético) – actua como quelante do cálcio, impedindo a coagulação. É utilizado para as contagens das células sanguíneas e plaquetas em contadores hematológicos automáticos e para o seu estudo em lâmina. Não altera a morfologia dos eritrócitos e dos leucócitos (até 2h após a colheita), evita a aglutinação das plaquetas, e conserva as células até 24h a 4°C. É ainda usado para a determinação da velocidade de sedimentação;
- **Citrato trissódico** – impede a ionização do cálcio através da formação de citrato de cálcio, impedindo a coagulação. É utilizado para os testes de hemostase.

2.2 Amostras

O **sangue total** com anticoagulante é utilizado para as contagens das células sanguíneas e plaquetas. O **plasma** é obtido por centrifugação do sangue total com anticoagulante. O seu aspecto macroscópico varia consoante o estado de saúde do indivíduo, ou seja, em situações fisiológicas é amarelado, a icterícia torna-o amarelo forte (devido ao aumento da bilirrubina), e a hemólise torna-o avermelhado. O **soro** é obtido por centrifugação do sangue total sem anticoagulante. É isento de fibrinogénio e restantes factores de coagulação.

3. TÉCNICAS MANUAIS

3.1 Esfregaço de sangue

No laboratório, o esfregaço de sangue é executado a partir de sangue total com EDTA. Consiste na extensão de uma camada fina de sangue sobre uma lâmina de vidro. É utilizado para o exame microscópico de amostras de sangue que inclui a observação de alterações da morfologia dos eritrócitos e leucócitos, execução manual da fórmula leucocitária, e observação e contagem das plaquetas. Permite ainda confirmar os alarmes dados pelos contadores hematológicos automáticos.

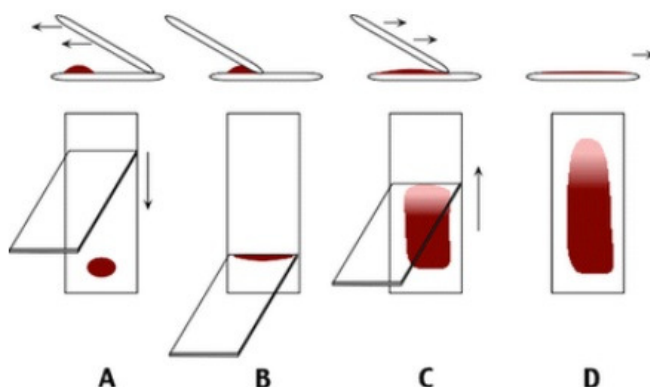


Figura 3.A¹¹ – Procedimento de execução de um esfregaço de sangue:

Garantir que a lâmina não tem pó ou gordura. **A)** Homogeneizar a amostra e colocar uma gota de sangue perto de uma das extremidades da lâmina; **B)** Segurar a lâmina com a mão esquerda, para que a gota fique próxima do dedo indicador e, com a mão direita, colocar uma lamela sobre a lâmina (estabelecendo um ângulo de 30°-45°) apoiando-a do lado esquerdo da gota; **C)** Deslocar a lamela sobre a lâmina, até encontrar a gota de sangue, deixando que esta se difunda ao longo da aresta da lamela; **D)** Com um movimento rápido e uniforme, deslizar a lamela no sentido do dedo polegar até que o sangue se esgote; Identificar a lâmina na zona da cabeça do esfregaço e deixar secar completamente.

Um esfregaço de sangue deve ser liso e homogêneo com bordos bem definidos e franja, a sua espessura deve diminuir da cabeça para a cauda, e não deve apresentar vacúolos (lâmina com gordura) nem estrias. Deve secar completamente antes de ser corado para que a morfologia dos eritrócitos não se altere, e deve ser devidamente identificado. Não deve ser demasiado espesso, pois as células ficariam sobrepostas, não deve ser demasiado fino pois as células ficariam muito dispersas dificultando o seu estudo, e não deve ser irregular, o que significaria que as células estariam mal distribuídas.

No laboratório é utilizado o kit de coloração **Hemacolor** que inclui 4 soluções: fixação, eosina (vermelha/alaranjada), azul de metileno (azul) e tampão de fosfato (pH 7.2). O tempo de coloração é bastante curto. Permite a observação de vários tipos de material intracelular.

O resultado da coloração depende de vários factores, incluindo o pH das soluções utilizadas, a fixação, o tempo de coloração, entre outros. Os componentes citoplasmáticos básicos coram de rosa-alaranjado, o núcleo e os componentes ácidos coram de azul-arroxeadado, e as granulações coram de rosa (Tabela 3.A).

Tabela 3.A – Cores esperadas para cada célula/componente celular.

Célula/Componente celular	Cor
Núcleos	Azul-arroxeadado
Citoplasma dos linfócitos	Azul
Citoplasma dos monócitos	Azul-acinzentado
Grânulos dos neutrófilos	Rosa-acinzentado
Grânulos dos eosinófilos	Laranja-acastanhado
Grânulos dos basófilos	Roxo a preto
Plaquetas	Violeta
Eritrócitos	Rosa a vermelho

4. TÉCNICAS AUTOMATIZADAS

4.1 Contadores Hematológicos

No laboratório é utilizado o analisador **Coulter LH750** (Beckman Coulter), que consiste num sistema automatizado para a quantificação diferencial das células sanguíneas e plaquetas, e determinação de vários parâmetros (Figura 4.A).



Figura 4.A ² – Coulter LH750.

Utiliza amostras de sangue total com EDTA, que devem ser colocadas a homogeneizar em agitadores rotativos de tubos, previamente ao seu processamento.

4.1.1 Princípio de funcionamento

Este aparelho utiliza a tecnologia VCS (Volume, Conductivity and Scatter) com base em dois princípios: a condutividade eléctrica e a dispersão de luz.

Segundo o Princípio de Coulter, uma suspensão condutora de células sanguíneas atravessa um pequeno orifício ladeado por dois eléctrodos que estabelecem uma corrente eléctrica, e a passagem de cada célula causa um aumento (dependente da sua dimensão) da resistência eléctrica entre os eléctrodos. O impulso eléctrico criado pode ser contado e medido. O número de impulsos traduz o número de células e a intensidade de cada impulso é proporcional ao volume celular, permitindo a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

A análise diferencial dos leucócitos é efectuada também através de um fluxo celular, após lise dos eritrócitos, por medição do volume, condutividade e dispersão da luz. Uma corrente de baixa frequência mede o volume das células, uma corrente de elevada frequência caracteriza os componentes nucleares e granulares da célula e a composição química intracelular, e um método óptico relaciona a dimensão e a refractibilidade das células com o ângulo da dispersão de luz proveniente de um laser. Nesta análise são também detectados e quantificados os eritroblastos.

Para a análise dos reticulócitos, é usada uma coloração vital, Novo Azul de Metileno, que é incubada com as amostras de sangue total e precipita as substâncias basofílicas presentes nos reticulócitos. A imaturidade celular é relacionada com o volume e dispersão de luz.

4.1.2 Parâmetros

Neste aparelho, os parâmetros podem ser medidos directamente, obtidos a partir de histogramas ou calculados.

O hemograma consiste num conjunto de determinações hematológicas efectuadas em amostras de sangue total e inclui (Tabelas 4.A, 4.B e 4.C):

- Contagem de células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos, reticulócitos) e plaquetas;
- Determinação do hematócrito;
- Quantificação da hemoglobina;
- Cálculo dos índices eritrocitários (volume globular médio, hemoglobina globular média e concentração de hemoglobina globular média);
- Fórmula leucocitária;
- Estudo da morfologia dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Tabela 4.A – Parâmetros avaliados no analisador Coulter LH750.

Parâmetro	Determinação
Eritrócitos (RBC – Red Blood Cells) Número de eritrócitos num determinado volume de sangue total	<u>Aparelho</u> : Contagem directa do número de células (multiplicada por um factor de calibração)
Hemoglobina (Hb) Quantidade de hemoglobina contida num determinado volume de sangue total	<u>Aparelho</u> : Comparação de transmitância (amostra e branco) $Hb(g/dL) = \text{Factor de Calibração} \times \log_{10} \frac{T \text{ Branco}(\%)}{T \text{ Amostra}(\%)}$
Volume Globular Médio (VGM) Volume médio dos eritrócitos de um indivíduo	<u>Manual</u> : $VGM(fL) = \frac{Ht(L/L)}{RBC(\times 10^6 / \mu L)}$ <u>Aparelho</u> : histograma dos eritrócitos (e aplicação de um factor de calibração)
Hematócrito (Ht) Volume ocupado pelos eritrócitos num determinado volume de sangue total	<u>Aparelho</u> : $Ht(\%) = \frac{RBC(10^6 / \mu L) \times VGM(fL)}{10}$
Hemoglobina Globular Média (HGM) Quantidade média de hemoglobina contida nos eritrócitos de um indivíduo	<u>Manual</u> : $HGM(pg) = \frac{Hb(g/dL)}{RBC(\times 10^6 / \mu L)} \times 10$ <u>Aparelho</u> : $HGM(pg) = \frac{Hb(g/dL)}{GV(\times 10^6 / \mu L)} \times 10$
Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) Concentração média de hemoglobina por unidade de volume de eritrócitos	<u>Manual</u> : $CHGM(g/dL) = \frac{Hb(g/dL)}{Ht(L/L)}$ <u>Aparelho</u> : $CHGM(g/dL) = \frac{Hb(g/dL)}{Ht(\%)} \times 100$
Coeficiente de Dispersão Eritrocitária (RDW) Coeficiente da variação da distribuição de volumes dos eritrócitos de um indivíduo	<u>Aparelho</u> : histograma dos eritrócitos
Plaquetas Número de plaquetas	<u>Aparelho</u> : histograma das plaquetas (e aplicação de um factor de calibração)
Volume Plaquetar Médio (VPM) Volume médio das plaquetas de um indivíduo	<u>Aparelho</u> : histograma das plaquetas (e aplicação de um factor de calibração)
Reticulócitos (Retic) Número de reticulócitos	<u>Aparelho</u> : contagem do número de reticulócitos e aplicação das fórmulas: $Retic(\%) = \frac{\Sigma \text{Reticulócitos}}{GV(\times 10^6 / \mu L)} \times 100$ $Retic(\times 10^9 / L) = \frac{Retic(\%) \times RBC(\times 10^6 / \mu L)}{100}$
Volume Reticular Médio (VRM) Volume médio dos reticulócitos de um indivíduo	<u>Aparelho</u> : algoritmo aplicado ao valor de reticulócitos

Tabela 4.B – Parâmetros avaliados no analisador Coulter LH750 (cont.).

Parâmetro	Determinação
Leucócitos	
Número de leucócitos num determinado volume de sangue total	<u>Aparelho</u> : contagem directa do número de células (e multiplicação por um factor de calibração)
	<u>Manual</u> : Contagem diferencial em 100 leucócitos
Fórmula Leucocitária	<u>Aparelho</u> :
Contagem diferencial de cada subpopulação leucocitária	$\text{Subpopulação (\%)} = \frac{\text{Número de células em cada área do data plot}}{\text{Número total de leucócitos no dataplot}} \times 100$ $\text{Subpopulação} (\times 10^3 / \mu\text{L}) = \frac{\text{Subpopulação (\%)}}{100} \times \text{WBC} (\times 10^3 / \mu\text{L})$

Tabela 4.C – Valores de referência dos parâmetros referidos.

Parâmetro	Valores de Referência			Unidades
	Homem	Mulher	Recém-Nascido	
Eritrócitos	4.0-6.0	4.0-5.4	4.0-6.0	n x 10 ⁶ /μL
Hb	14-18	12-16	14-22	g/dL
Ht	42-52	37-47	43-62	%
VGM	80-100		75-120	fL
HGM	28-32		34-42	pg
CHGM	32-36		26-36	g/dL
RDW	11.5-14			%
Plaquetas	150-400		150-450	n x 10 ³ /μL
VPM	6.8-8.8			fL
Reticulócitos	0.5-2.5		2.5-6.5	%
VRM	100.5-121.8			fL
Leucócitos	5.0-10.0		5.0-28.5	n x 10 ³ /μL
Fórmula Leucocitária		n x 10 ³ /μL	%	Nos recém-nascidos a fórmula depende da idade. Nas crianças ocorre uma inversão da fórmula (no que diz respeito aos linfócitos e neutrófilos)
	Neutrófilos	2,5-7,0	50-70	
	Eosinófilos	0,04-0,4	1-5	
	Basófilos	0,01-0,1	0-1	
	Linfócitos	1,0-3,5	20-40	
	Monócitos	0,2-0,8	2-10	-

4.2 Velocidade de Sedimentação

No laboratório é utilizado o aparelho **Test 1 BCL** (Alifax) para a determinação da velocidade de sedimentação globular (Figura 4.B).



Figura 4.B² – Test 1 BCL.

Utiliza amostras de sangue total com EDTA. Não requer o uso de reagentes e apresenta uma elevada correlação com o método de Westergreen. Expressa os resultados em mm/h.

4.2.1 Princípio de funcionamento

Baseia-se no método de Westergreen, no qual são utilizados tubos graduados fechados para a determinação da velocidade de sedimentação globular em mm/h. No aparelho, este parâmetro é determinado por fotometria cinética, que mede o ritmo de formação de agregados de eritrócitos e o seu tamanho na fase de agregação. São efectuadas medições da densidade óptica da amostra num capilar, e o resultado final é obtido através de um algoritmo matemático que transforma os valores de densidade óptica em mm/h.

4.2.2 Definição

A velocidade de sedimentação globular consiste na velocidade a que sedimentam os eritrócitos que se encontram em suspensão no plasma. O seu valor depende da diferença entre as densidades dos eritrócitos e do plasma, da contra-corrente plasmática, da capacidade de agregação dos eritrócitos (que resulta na formação de rouleux), do número, forma e tamanho

dos eritrócitos, da viscosidade do sangue, do teor de fibrinogénio e globulinas plasmáticas, da temperatura, da proporção anticoagulante-sangue, entre outros (Tabela 4.D).

Tabela 4.D – Valores de referência da velocidade de sedimentação globular (mm).

	Homem	Mulher
< 50 anos	10	13
> 50 anos	13	20

A velocidade de sedimentação exhibe aumentos fisiológicos relacionados com a idade, sexo feminino, período menstrual e gravidez. O aumento patológico está associado a situações de infecção, inflamação, anemia, leucemias, mielomas, entre outros, e a diminuição patológica está associada a situações de poliglobulia, hipofibrinogénemia, alterações da forma dos eritrócitos, entre outros.

4.3 Coagulação

No laboratório é utilizado o sistema BCS (Siemens) que consiste num sistema de coagulação para o processamento de ensaios coagulométricos, cromogénicos e imunoturbidimétricos, em amostras de plasma obtido através da centrifugação de sangue total com citrato trissódico (Figura 4.C).

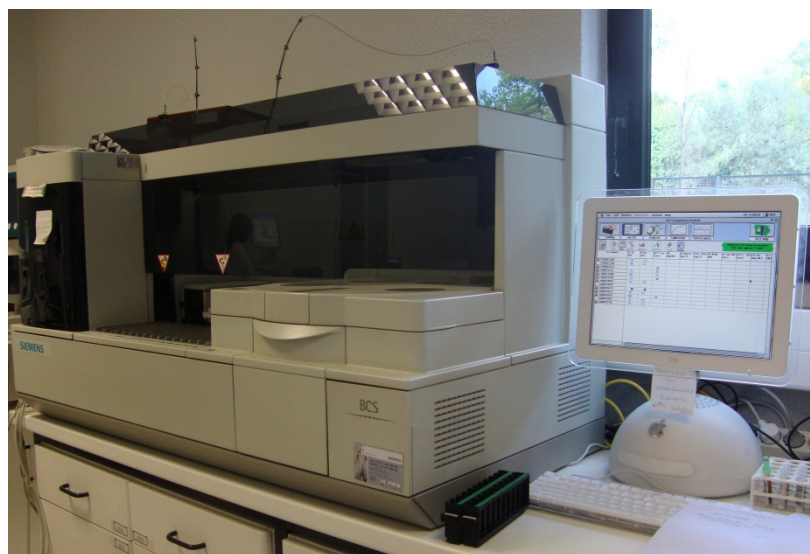


Figura 4.C ² – Sistema BCS.

4.3.1 Princípio de funcionamento

Este aparelho baseia-se no princípio da fotometria e turbidimetria. Possui uma fonte de radiação e filtros que permitem obter luz no comprimento de onda desejado. O sistema de lentes ajusta a direcção da luz, para que esta atravessasse as cuvetes das amostras de forma paralela. Ao atravessar a cuvette, a luz é enfraquecida devido à dispersão causada pelas partículas. Nos ensaios coagulométricos, a amostra torna-se mais turva, reduzindo a intensidade de luz que a atravessa. Nos ensaios cromogénicos é libertado um pigmento durante a reacção, o que reduz a intensidade de luz que atravessa a amostra. Nos ensaios imunoturbidimétricos, a formação de complexos imunes torna a amostra mais turva, diminuindo a intensidade de luz que a atravessa. Esta intensidade é depois medida e convertida em valores de absorvância.

4.3.2 A hemostase

A hemostase consiste no equilíbrio entre os processos de coagulação e fibrinólise, e tem como objectivo evitar hemorragias e trombozes. Engloba três fases.

A hemostase **primária** inclui todos os processos que levam à formação do trombo plaquetário. Tem início na ruptura da parede vascular. Verifica-se vasoconstrição para reduzir o fluxo sanguíneo. A ruptura do endotélio vascular expõe o subendotélio (camada mais trombogénica dos vasos) e colagénio, e leva à libertação de factor de von Willebrand. Este factor medeia a adesão das plaquetas ao colagénio e ao subendotélio, desencadeando a activação das plaquetas que conduz a alterações funcionais (como a libertação do conteúdo dos seus grânulos) e morfológicas (transformação de partículas discóides em partículas esféricas com pseudópodes). Estas alterações estimulam a agregação das plaquetas (mediada pelo fibrinogénio), conduzindo à formação do trombo plaquetário.

A hemostase **secundária** ou **coagulação** inclui todas as reacções químicas que levam à formação do coágulo de fibrina. É mediada por plaquetas, cálcio, e factores plasmáticos que circulam inactivos no plasma. A membrana fosfolipídica das plaquetas constitui uma superfície pró-coagulante onde se dá a ligação (mediada por cálcio) e activação dos factores da coagulação. A coagulação ocorre através das vias extrínseca (tecidual) e intrínseca (de contacto) que convergem na via comum. Esta, por sua vez, culmina na formação do coágulo de fibrina (Figura 4.D).

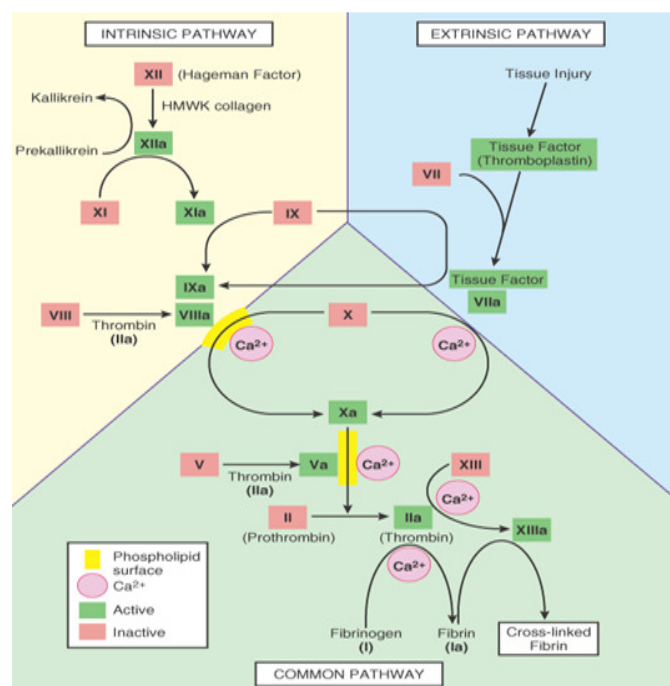


Figura 4.D ¹² – Cascata de coagulação.

A hemostase **terciária** ou **fibrinólise** inclui todos os processos que levam à destruição do coágulo de fibrina e restabelecimento do fluxo normal de sangue. Nesta fase, o plasminogénio é convertido em plasmina por acção dos factores XII, calicreína, estreptocinase, entre outros. A plasmina é uma enzima proteolítica que degrada o coágulo de fibrina e os restantes factores da coagulação. Os produtos de degradação da fibrina são denominados por fragmentos X, Y, D e E, e inibem a polimerização dos monómeros de fibrina e a agregação plaquetária.

4.3.3 Parâmetros

Os parâmetros determinados no sistema BCS, assim como os respectivos valores de referência, encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela 4.E – Parâmetros determinados no sistema BCS.

Parâmetro	Princípio	Interesse
Tempo de Protrombina (TP) e Ratio Normalizado Internacional (INR)	▪ Reagente Thromborel S ▪ Ensaio coagulométrico ▪ Incubação da amostra de plasma com quantidades óptimas de tromboplastina e cálcio ▪ Medição do tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina	▪ Avaliação da actividade dos factores de coagulação VII, IX, X, V e II (via extrínseca) ▪ Útil na avaliação de indivíduos sob o efeito de anticoagulantes orais e na avaliação pré-operatória ▪ Aumenta – deficiência dos factores referidos; deficiência dos factores dependentes da vitamina K
Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (PTT)	▪ Reagente Pathromtin SL ▪ Ensaio coagulométrico ▪ Incubação da amostra de plasma com quantidades óptimas de fosfolípidos e um activador de superfície ▪ Medição do tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina	▪ Avaliação da actividade dos factores de contacto e XI, IX, VIII e X (via intrínseca) ▪ Útil na monitorização da terapêutica com heparina (mas não é recomendado para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais) ▪ Teste não sensível à disfunção plaquetária ▪ Aumenta – deficiência dos factores referidos

Tabela 4.F – Parâmetros determinados no sistema BCS (cont.).

Parâmetro	Princípio	Interesse
Fibrinogénio (Fib)	▪ Reagente Multifibren U ▪ Ensaio coagulométrico ▪ Na presença de excesso de trombina, o fibrinogénio é transformado em fibrina ▪ O tempo de formação do coágulo é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio presente	▪ Valores aumentados constituem um factor de risco para as doenças cardiovasculares ▪ Aumenta – estados inflamatórios (cirurgias, traumas, infecções, enfarte agudo do miocárdio, neoplasias e doenças inflamatórias crónicas) ▪ Valores baixos são encontrados em hipofibrinogénias ou afibrinogénias, adquiridas ou congénitas
D-Dímeros (Dd)	▪ Reagente Innovance D-Dimer ▪ Ensaio imunoturbidimétrico ▪ Utiliza partículas de poliestireno revestidas com anticorpos monoclonais (estes agregam-se na presença de D-dímeros, e causam o aumento da turvação)	▪ São produtos de degradação da fibrina, resultantes da acção da plasmina (fibrinólise) ▪ Aumenta – doença tromboembólica, coagulopatia intravascular disseminada, complicações obstétricas, cirurgias
Antitrombina III, Functional (AtTrombIII)	▪ Reagente Berichrom Antitrombina III (A) ▪ Ensaio cromogénico ▪ A antitrombina III da amostra é convertida num inibidor imediato através da heparina, e inactiva a trombina presente ▪ O conteúdo residual de trombina é determinado num teste cinético no qual é medida a absorvância (405 nm), de acordo com as reacções: $1) \text{AT III}_{\text{amostra}} + \text{Trombina}_{\text{excedente}} \xrightarrow{\text{Heparina}} [\text{AT III-Trombina}] + \text{Trombina}_{\text{residual}}$ $2) \text{Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA} \xrightarrow{\text{Trombina residual}} \text{Tos-Gly-Pro-Arg-OH+ANBA-IPA}$	▪ É o principal inibidor fisiológico da coagulação. Tem como cofactor a heparina e actua através da inibição da trombina e do factor Xa ▪ Aumenta – transplante renal recente, uso de medicamentos anticoagulantes orais ▪ Valores baixos são encontrados na deficiência genética de antitrombina III

Tabela 4.G – Parâmetros determinados no sistema BCS (cont.).

Parâmetro	Princípio	Interesse
Proteína C, Functional (ProtC)	- Reagente Berichrom Proteína C - Ensaio cromogénico - A proteína C presente nas amostras é activada através de um activador específico de veneno de serpente - A proteína activada resultante é determinada com um teste cinético no qual é medida a absorvância (405 nm), de acordo com as reacções: 1) Proteína C_{amostra} $\xrightarrow{\text{Activador}}$ Proteína C_{activada} 2) p-Glu-Pro-Arg-MNA $\xrightarrow{\text{Proteína C activada}}$ p-Glu-Pro-Arg-OH+MNA	- É um inibidor da coagulação que regula a actividade dos factores V e VIII Valores baixos aumentam o risco de trombozes venosas
Resistência à Proteína C Activada (ResistProtC)	- Teste de rastreio ProC Ac R - Ensaio coagulométrico - Incubação do plasma com veneno de víbora Russell - Resultado prolongado nos indivíduos normais - Resultado obtido segundo o ratio: $\frac{\text{Tempo de coagulação com activador}}{\text{Tempo de coagulação com tampão}}$	- A resistência à proteína C activada é causada pelo defeito genético do factor V de Leiden, cuja inactivação torna-se mais demorada - Resulta num aumento da tendência de coagulação - É uma das causas de trombofilia hereditária
Anticoagulante Lúpico (AtCoagLup)	- Reagentes de rastreio LA1 e de confirmação LA2 - O reagente de rastreio LA1 (que contém veneno da víbora de Russell) provoca a coagulação do plasma por activação do factor X. O anticoagulante lúpico prolonga o tempo de coagulação deste reagente - O reagente de confirmação LA2 é semelhante, mas contém uma concentração de fosfolípidos superior. Estes reagem com o anticoagulante lúpico e corrigem o tempo de coagulação - Resultado obtido segundo o ratio: $\frac{\text{Tempo de coagulação com LA1}}{\text{Tempo de coagulação com LA2}}$	- O anticoagulante lúpico é constituído por autoanticorpos anti-fosfolípidos carregados negativamente, anti-complexos de fosfolípidos com β2-glicoproteína ou anti-factores de coagulação - Ocorre em patologias autoimunes - É considerado um factor de risco para os pacientes com trombozes de etiologia desconhecida - É detectado com frequência em mulheres que sofrem abortos recorrentes

Tabela 4.H – Valores de referência dos parâmetros referidos.

Parâmetro	Valores de Referência
TP	70-120%
INR	0.9-1.3%
PTT	25-36 seg
Fib	150-450 mg/dL
Dd	Até 500 µg/L
AtTrombIII	75-125%
ProtC	70-140%
ResistProtC	Negativo >2.2%
	Duvidoso 1.5-2.1%
	Positivo ≤1.4%
AtCoagLup	Negativo/Positivo

5. ALGUMAS PATOLOGIAS

5.1 Alterações Morfológicas dos Eritrócitos

Os eritrócitos são células anucleadas com forma de disco bicôncavo cujo período de vida média é de cerca de 120 dias. Têm um diâmetro de aproximadamente 7 µm e uma espessura de cerca de 2 µm. A sua principal função é o transporte de O₂ dos pulmões até aos tecidos e de uma parte do CO₂ dos tecidos até aos pulmões. São células normocíticas (VGM 80-100 fL) e normocrômicas (CHGM 32-36 g/dL) com HGM 28-32 pg e RDW 11.5-14%.

Nas tabelas seguintes são referidas alterações da dimensão, conteúdo em hemoglobina, forma e distribuição dos eritrócitos, assim como algumas inclusões frequentemente observadas nestas células.

Tabela 5.A – Alteração da dimensão dos eritrócitos.

Anisocitose	Definição	Patologias (exemplos)
Microcitose	Diminuição da dimensão ▪ VGM <80 fL	▪ Anemias ferropénica, sideroblástica ▪ Talassémias
Macrocitose	Aumento da dimensão ▪ VGM >100 fL	▪ Anemia megaloblástica ▪ Reticulocitose ▪ Alcoolismo ▪ Aplasia medular ▪ Neoplasias
Anisocitose	Coexistência de duas populações (macrocítica e microcítica)	▪ Eritrócitos de tamanho variado

Tabela 5.B – Alteração do conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos.

Anisocromia	Definição	Patologias (exemplos)
Hipocromia	Diminuição da concentração ▪ CHGM <32 g/dL ▪ HGM <27 pg	▪ Anemias ferropénica, sideroblástica ▪ Talassémias
Hipercromia	Aumento da concentração ▪ CHGM >36 g/dL ▪ VGM <80 fL	▪ Esferocitose
Anisocromia	Coexistência de duas populações (hipocrômica e hiperocrômica)	▪ Anemia ferropénica em resposta a terapêutica ▪ Anemia sideroblástica
Policromatofilia	Aumento do número de reticulócitos	▪ Reticulocitose

Tabela 5.C – Alterações da forma dos eritrócitos.

Poiquilocitose	Definição	Patologias (exemplos)
Poiquilocitose	Presença de formas variadas, sem predomínio	▪ Anemias ferropénica, megaloblástica, hemolítica ▪ Talassémias
Esferocitose	Forma esférica (microcitose e hipercromia)	▪ Esferocitose hereditária ▪ Anemia hemolítica ▪ Reacção a transfusão sanguínea
Eliptocitose	Forma ovalada/alongada	▪ Eliptocitose hereditária ▪ Anemia megaloblástica, ferropénica ▪ Talassémias
Estomatocitose	Presença de uma fenda central semelhante a um estoma	▪ Estomatocitose hereditária ▪ Anemia hemolítica ▪ Alcoolismo ▪ Cirrose
Knisocitose	Forma tricôncava	▪ Anemia hemolítica ▪ Hemoglobinopatias
Dianocitose ou Target cells ou Células em alvo	Zona central mais intensa (forma de alvo)	▪ Doenças hepáticas ▪ Após esplenectomia ▪ Talassémias ▪ Drepanocitose ▪ Anemia hemolítica
Drepanocitose	Forma de foice	▪ Drepanocitose ou anemia falciforme ▪ Talassémias
Acantocitose	Presença de algumas espículas heterogêneas	▪ Acantocitose hereditária ▪ Doenças hepáticas ▪ Alcoolismo
Equinocitose	Presença de muitas espículas homogêneas	▪ Urémia ▪ Insuficiência renal ▪ Deficiência em piruvato-cinase
Dacriocitose	Forma de gota de água	▪ Talassémias ▪ Anemias ferropénica, megaloblástica ▪ Esplenomegália ▪ Doença renal
Queratocitose	Presença uma ou duas projecções semelhantes a chifres	▪ Anemia hemolítica microangiopática ▪ Coagulação vascular disseminada ▪ Anemia hemolítica secundária a implantes
Esquisocitose	Fragmentos de eritrócitos de forma irregular	▪ Anemia hemolítica secundária a implantes ▪ Anemia hemolítica microangiopática ▪ Coagulação vascular disseminada ▪ Talassémias ▪ Queimaduras

Tabela 5.D – Alterações na distribuição dos eritrócitos.

Distribuição	Definição	Patologias (exemplos)
Rouleaux	Pilhas	▪ Artefactos ▪ Aumento de proteínas plasmáticas
Aglutinação	Aglomerados irregulares	▪ Anticorpos anti-membrana de eritrócito ▪ Anemias hemolíticas auto-imunes ▪ Crioaglutininas

Tabela 5.E – Inclusões eritrocitárias encontradas em algumas patologias.

Inclusões Eritrocitárias	Características	Patologias (exemplos)
Pontuado Basófilo	Grânulos finos azuis-arroxeados (ribossomas, RNA e mitocôndrias) distribuídos por todo o eritrócito	▪ Perturbações da eritropoiese ▪ Alterações na síntese de hemoglobina ▪ Talassémias ▪ Anemias megaloblástica, sideroblástica ▪ Alcoolismo
Anéis de Cabot	Inclusão ovalada ou em forma de 8, vermelho-violeta (restos da membrana nuclear ou de fuso mitótico)	▪ Anemia perniciosa
Corpos de Howell-Jolly	Inclusões redondas (uma ou duas) que correspondem a restos de DNA	▪ Anemias megaloblástica, hemolítica ▪ Esplenectomia
Corpos de Heinz	Inclusões (hemoglobina precipitada) que se acumulam junto à membrana dos eritrócitos	▪ Deficiência em G6PD ▪ Anemia hemolítica ▪ Hemoglobinopatias
Corpos de Pappenheimer	Grânulos sideróticos de ferro, ferritina, hemossiderina	▪ Anemia sideroblástica ▪ Talassémias ▪ Após esplenectomia

5.2 Anemia

A anemia é uma alteração hematológica bastante frequente. Define-se como a diminuição da concentração de hemoglobina circulante e funcional, associada ou não à diminuição do número de eritrócitos.

No diagnóstico de uma anemia é necessário conhecer a idade, sexo, dieta, hábitos, profissão e história clínica. Os sintomas incluem palidez, taquicardia, fadiga, astenia, entre outros.

A caracterização do tipo de anemia requer o estudo do hemograma, particularmente dos parâmetros VGM (anemia microcítica, normocítica ou macrocítica) e CHGM (anemia hipocrômica, normocrômica ou hipercrômica). É também importante a caracterização da resposta da medula, isto é, se a anemia é arregenerativa e resulta da produção insuficiente de eritrócitos pela medula, ou regenerativa e resulta da perda de eritrócitos por hemorragia ou por hemólise, com resposta activa por parte da medula para repôr os níveis normais.

Nas tabelas seguintes encontra-se a caracterização de vários tipos de anemia.

Tabela 5.F – Tipos de anemia, características e causas.

Anemia	Características	Causas
Megaloblástica (macrocítica)	Falha na síntese de DNA (eritropoiese ineficaz) e hemólise dos eritrócitos (ovalócitos)	<u>Deficiência em vitamina B12</u> – dieta inadequada, má absorção por deficiência em factor intrínseco (anemia perniciosa) <u>Deficiência em ácido fólico</u> – dieta inadequada, má absorção, necessidades aumentadas (gravidez), interferência metabólica de fármacos ou álcool
Ferropénica (microcítica hipocrômica)	- Diminuição da síntese da hemoglobina - Poiquilocitose - Hipersegmentação de neutrófilos	<u>Deficiência em ferro</u> – dieta inadequada, hemorragias, necessidades aumentadas (crescimento, gravidez), má absorção
Das Doenças Crónicas (normocítica normocrômica com conversão em microcítica hipocrômica)	Falha na síntese da hemoglobina	<u>Bloqueio do ferro nos seus depósitos</u> – infecções crónicas, síndromes inflamatórias não infecciosas, neoplasias, queimaduras
Sideroblástica (hipocrômica)	Formação de sideroblastos em anel	<u>Falha na incorporação de ferro na síntese de hemoglobina</u> – alcoolismo, intoxicação por chumbo, fármacos

Tabela 5.G – Tipos de anemia, características e causas (cont.).

Anemia	Características	Causas
Aplásica (normocítica normocrômica)	▪ Diminuição da produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas ▪ Reticulopénia ▪ Hipsiderémia	▪ <u>Insuficiência medular</u> – congénica ou adquirida (fármacos, agentes químicos, radiações, infecções, leucemias, síndromes mieloproliferativas)
Hemolítica (arregenerativa)	▪ Destrução massiva dos eritrócitos	▪ <u>Intracorporculares</u> – defeitos membranares (esferocitose e eliptocitose hereditária), enzimáticos (piruvato cinase, glucose-6-fosfato desidrogenase) ou da hemoglobina (hemoglobinopatias) ▪ <u>Extracorporculares imunitárias</u> – anticorpos anti-eritrócitos ▪ <u>Extracorporculares não imunitárias</u> – fármacos, substâncias tóxicas, fragmentação mecânica, parasitas, reacção transfusional
Devida a hemorragia (normocítica; regenerativa)	▪ Perda massiva de eritrócitos ▪ Reticulocitose	▪ <u>Hemorragias</u>

5.3 Hemoglobinopatias

No diagnóstico de uma hemoglobinopatia interessa conhecer:

- História clínica – anemia persistente, esplenomegália, entre outros;
- História familiar – origem geográfica, consanguinidade, entre outros;
- Hemograma – eritrocitose, microcitose, hipocromia, entre outros;
- Concentração de HbA₂.

As hemoglobinopatias são patologias hereditárias que afectam a hemoglobina. Incluem talassémias (ausência ou diminuição da síntese de uma das cadeias de globina) e variantes de hemoglobina (alteração da estrutura de uma das cadeias de globina) (Tabela 5.H).

Tabela 5.G – Causas e características das principais hemoglobinopatias.

Patologia	Alteração	Fenótipo
α- Talassémia	▪ Diminuição da síntese das cadeias α (delecção de um ou mais alelos do gene que as codifica) ▪ Afecta os 3 tipos de Hb do adulto (HbA, HbA₂ e HbF)	▪ Formação de tetrâmeros sem cadeias α: HbH (β4) (adultos) e HbBart (γ4) (feto) ▪ Anemia microcítica hipocrómica (gravidade variável)
β- Talassémia	▪ Diminuição da síntese das cadeias β (mutações pontuais no gene que as codifica)	▪ Aumento da proporção de HbA₂ e HbF em relação à HbA ▪ Anemia microcítica hipocrómica acompanhada de anemia hemolítica e hiperplasia medular (nas formas mais graves)
HbS	▪ Substituição, na cadeia β, de um ácido glutâmico por uma valina	▪ Em desoxigenação, há redução da solubilidade da HbS e esta polimeriza; os polímeros deformam o eritrócito, que adquire forma de foice (drepanocitose) ▪ Anemia hemolítica crónica (em homozigotia)
HbC	▪ Substituição, na cadeia β, de um ácido glutâmico por uma lisina	▪ Diminuição da HbA ▪ Anemia hemolítica crónica (em homozigotia)
HbE	▪ Substituição, na cadeia β, de um ácido glutâmico por uma lisina	▪ Diminuição da HbA
HbD	▪ Substituição, na cadeia β, de um ácido glutâmico por uma glicina	▪ Anemia hemolítica crónica (em heterozigotia com a HbS)

5.4 Alterações dos Leucócitos

Os leucócitos englobam neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. As suas principais características encontram-se sumarizadas na tabela seguinte.

Tabela 5.H – Características dos leucócitos.

Célula	Dimensão	Citoplasma	Núcleo	Função
Neutrófilo	12-14 μm	Granulações neutrófilas abundantes	- Cromatina densa 2-5 lóbulos interligados por pontes de cromatina	- Leucócito predominante do sangue periférico de um adulto saudável - Fagocitose - Primeira defesa contra microrganismos patogénicos
Eosinófilo	12-17 μm	Granulações eosinófilas abundantes	- Cromatina densa - Bilobado (por vezes trilobado)	- Fagocitose - Modulação das reacções de hipersensibilidade imediata - Defesa contra alguns parasitas
Basófilo	10-14 μm	Granulações basófilas distribuídas irregularmente	- Cromatina densa - Bilobado ou trilobado - É de difícil observação	Mediador das respostas inflamatórias e das reacções de hipersensibilidade imediata
Linfócito	6-10 μm (pequeno linfócito) 15-18 μm (grande linfócito)	Não apresenta granulações	- Dimensão aproximada aos eritrócitos - Cromatina muito densa	- Linfócitos B e T – resposta imunitária adaptativa - Linfócitos B – síntese de anticorpos - Linfócitos T – funções variadas - Linfócitos NK – reconhecimento de células estranhas ao organismo (vírus e células cancerosas)
Monócito	15-30 μm	Granulações finas e vacúolos	- Cromatina pouco densa - Grande polimorfismo	- Fagocitose - Apresentação de antígenos digeridos aos linfócitos T - Actividade citotóxica contra células tumorais

Na tabela seguinte encontram-se sumarizadas as principais alterações dos leucócitos.

Tabela 5.I – Alterações quantitativas e qualitativas dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), linfócitos e monócitos.

Alteração	Definição	Situações clínicas (exemplos)
Neutrofilia	Aumento do número de neutrófilos circulantes por aumento de produção, retenção na circulação, ou deslocação para a circulação	▪ Hereditária ▪ Infecções bacterianas ▪ Inflamação crónica ▪ Síndrome mieloproliferativa ▪ Tabagismo ▪ Fármacos
Neutropénia	Diminuição do número de neutrófilos circulantes por diminuição de produção, saída da circulação para os tecidos, ou aumento da destruição celular	▪ Hereditária ▪ Imune ▪ Infecções virais ▪ Anemia aplásica ▪ Fármacos
Granulação tóxica	Aumento da dimensão das granulações dos neutrófilos	▪ Infecções bacterianas ▪ Queimaduras
Desgranulação	Ausência de granulações dos neutrófilos	▪ Síndrome mielodisplásico
Corpos de Döhle	Inclusões grosseiras e basófilas junto à membrana citoplasmática dos neutrófilos	▪ Infecções graves (escarlatina) ▪ Queimaduras ▪ Fármacos
Vacuolização tóxica	Vacúolos citoplasmáticos nos neutrófilos	▪ Fagocitose de bactérias
Hipersegmentação	Núcleo dos neutrófilos com mais de 5 lóbulos	▪ Anemia megaloblástica ▪ Fármacos ▪ Síndrome mielodisplásico
Hiposegmentação	Núcleo dos neutrófilos com menos de 3 lóbulos	▪ Neutrofilia reactiva ▪ Leucemias
Eosinofilia	Aumento do número de eosinófilos circulantes	▪ Reacções alérgicas ▪ Infecções parasitárias ▪ Fármacos ▪ Síndrome mieloproliferativa
Anomalia de Pelger-Huët	Defeito na lobulação do núcleo dos granulócitos	▪ Hereditária ▪ Leucemias (após quimioterapia)
Anomalia de Alder-Reilly	Aparecimento de granulações semelhantes às tóxicas (neutrófilos) em todos os leucócitos	▪ Hereditária

Tabela 5.J – Alterações quantitativas e qualitativas dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), linfócitos e monócitos (cont.).

Alteração	Definição	Situações clínicas (exemplos)
Linfocitose	Aumento do número de linfócitos circulantes	▪ Infância ▪ Infecções virais (mononucleose infecciosa) ▪ Leucemias ▪ Linfocitose infecciosa
Linfocitopénia	Diminuição do número de linfócitos circulantes	▪ Terapêutica com corticosteróides ▪ Stress ▪ Imunodeficiências (HIV)
Monocitose	Aumento do número de monócitos circulantes	▪ Infecções bacterianas crónicas ▪ Síndromes inflamatórias ▪ Leucemias
Monocitopénia	Diminuição do número de monócitos circulantes	▪ Terapêutica com corticosteróides

5.5 Alterações da Hemostase

As plaquetas são fragmentos discóides anucleados do citoplasma de megacariócitos, com diâmetro de 2-4 μm e espessura de aproximadamente 1 μm . São os elementos mais pequenos do sangue periférico. Têm vida média de 8-12 dias. As suas funções estão principalmente relacionadas com os processos da hemostase e coagulação.

Existem várias alterações (congénitas e adquiridas) que afectam a hemostase, conduzindo a eventos hemorrágicos ou trombóticos. Incluem anomalias nas plaquetas, nos vasos, e nos processos de coagulação e fibrinólise. São apresentados alguns exemplos nas tabelas seguintes.

Tabela 5.K – Alterações quantitativas das plaquetas.

Alteração	Definição	Situações clínicas
Trombocitose	Aumento do número de plaquetas circulantes	▪ Hereditária ▪ Após intervenções cirúrgicas ▪ Hemorragias ▪ Anemia hemolítica ▪ Síndrome mieloproliferativo
Trombocitopénia	Diminuição do número de plaquetas circulantes por diminuição da produção, aumento da destruição ou retenção no baço	▪ Hereditária ▪ Anemia aplásica ▪ Esplenomegália ▪ Fármacos

Tabela 5.L – Patologias que afectam a hemostase primária.

Patologias Genéticas	
Doença de von Willebrand Carácter autossómico dominante	▪ Plaquetas em número e dimensão normais ▪ Diminuição, ausência ou modificação do factor de von Willebrand ▪ Defeito na ligação à membrana das plaquetas ▪ Defeito da adesão das plaquetas ao subendotélio ▪ Resulta em epistaxis, equimoses, menorragias
Síndrome de Bernard-Soulier Carácter autossómico recessivo	▪ Trombocitopenia e plaquetas gigantes ▪ Diminuição ou ausência de receptor GPIb/IX/V na membrana das plaquetas ▪ Defeito na ligação das plaquetas ao factor de von Willebrand ▪ Defeito da adesão das plaquetas ao subendotélio ▪ Resulta em hemorragias gastrointestinais, epistaxis, menorragias
Tromboastenia de Glanzmann Carácter autossómico recessivo	▪ Plaquetas em número e dimensão normais ▪ Diminuição ou ausência de receptor GPIIb/IIIa na membrana das plaquetas ▪ Defeito na ligação das plaquetas ao fibrinogénio ▪ Defeito na agregação plaquetária ▪ Resulta em equimoses, hemartroses, hemorragias intensas
Patologias Adquiridas	
Púrpura trombocitopénica	▪ Idiopática – presença de anticorpos anti-plaquetas, resultando em hemorragias graves ▪ Trombótica – formação de microtrombos em vários órgãos, com consumo das plaquetas, fragmentação dos eritrócitos, manifestações renais e cerebrais, e hemorragias

Tabela 5.M – Patologias que afectam a hemostase secundária.

Patologias Genéticas	
Hemofilia A e B Carácter recessivo ligado ao cromossoma X	▪ Diminuição da actividade dos factores VIII e IX, respectivamente ▪ Resulta em hemartroses
Patologias Adquiridas	
Défice de Vitamina K	▪ Deficiência dos factores de coagulação II, VII, IX e X
Doença hepática	▪ Deficiência em várias proteínas activadoras e inibidoras da coagulação e da fibrinólise
Inibidores da coagulação	▪ Inibidores específicos de factores da coagulação ▪ Inibidores de reacção
Coagulação Intravascular Disseminada	▪ Complicações obstétricas, presença de complexos imunes, bactérias ou vírus no sangue, ou lesão endotelial ▪ Deposição de fibrina, consumo dos factores de coagulação e das plaquetas, activação do sistema fibrinolítico – Processo intravascular de coagulação acelerada ▪ Resulta em trombose, hemorragia e insuficiência multi-orgânica

Tabela 5.N – Patologias que afectam a hemostase terciária.

Patologias Genéticas	
Deficiência de antitrombina III Carácter autossómico dominante	▪ Ausência de inibição da trombina e dos factores de coagulação X, IX e XI ▪ Resulta em trombose
Deficiência de Proteína C Carácter autossómico dominante	▪ Ausência da inactivação dos factores V e VIII na presença dos seus cofactores proteína C, fosfolípidos e cálcio ▪ Resulta em trombose
Deficiência de Proteína S Carácter autossómico dominante	▪ Ausência da inactivação dos factores V e VIII na presença dos seus cofactores ▪ Resulta em trombose
Factor V de Leiden Carácter autossómico dominante	▪ Uma mutação no gene faz com que o factor V seja resistente à acção da proteína C activada ▪ Aumento do risco de trombose
Protrombina Carácter autossómico dominante	▪ Uma mutação no gene faz com que haja uma concentração mais elevada de protrombina em circulação ▪ Aumento do risco de trombose
Patologias Adquiridas	
Síndrome Anti-fosfolípidos	▪ Associação de autoanticorpos anti-fosfolípidos (anti-cardiolipina, anti-β-glicoproteína e anticoagulante lúpico) ▪ Resulta em trombozes recorrentes, abortos de repetição e trombocitopénia

As deficiências em antitrombina III (muito grave) e proteínas C e S são relativamente raras, enquanto que a prevalência das mutações é superior. A combinação de diferentes defeitos é mais frequente, e conduz a sintomas mais precoces e mais graves.

CONTROLO DE QUALIDADE

1. FUNDAMENTO

O controlo de qualidade laboratorial inclui o Controlo de Qualidade Interno (CQI) e a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), e refere-se a todas as fases do ciclo de diagnóstico. Tem como objectivo garantir que os resultados se encontram dentro dos limites pré-definidos de precisão e exactidão.

1.1 CQI

O CQI consiste num processo estatístico usado para monitorizar e avaliar os métodos analíticos e validar os resultados obtidos, permitindo assegurar que estes podem ser utilizados com confiança no diagnóstico e prognóstico, e nas decisões terapêuticas.

Na prática, consiste na utilização regular de materiais de referência (de características conhecidas), cuja matriz é de material semelhante aos produtos biológicos testados, isto é, sangue total, soro, urina, entre outros. Normalmente são usados vários níveis de controlo (patológico baixo, normal e patológico alto), cujos valores deverão encontrar-se próximos dos níveis de decisão clínica. Estes produtos são testados nas mesmas condições que as amostras dos pacientes.

O CQI mantém sob limites bem definidos os erros a que o processo analítico está sujeito, permitindo o controlo da precisão e exactidão (afectadas por erros aleatórios (dispersão) e sistemáticos (tendência), respectivamente), através de gráficos de Levey-Jennings, que incluem os valores limite de confiança ($-2s$, $+2s$) e de controlo ($-3s$, $+3s$) para cada analito, e da aplicação das regras de Westgard. A combinação de ambos os tipos de erro resulta no erro total, isto é, o intervalo máximo resultante da influência dos erros sobre a média. O erro total de um método deve ser sempre inferior ao erro total admissível (margem de erro admissível para cada método, estipulada pelo laboratório com base em referências nacionais ou internacionais).

Sequidamente são apresentadas as estratégias de CQI aplicadas em cada valência.

1.1.1 Microbiologia

Na valência de Microbiologia, o CQI consiste no uso mensal de estirpes da colecção ATCC (American Type Culture Collection), para o controlo dos meios de cultura e de testes de identificação e susceptibilidade a agentes antimicrobianos (manuais e automatizados). Estas estirpes são caracterizadas e conservadas de forma a garantir a reproductibilidade dos resultados, minimizando os riscos de contaminação, deriva genética e mutação (Tabela 1.A).

Tabela 1.A – Exemplos de estirpes ATCC utilizadas no CQI mensal.

Referência ATCC	Microrganismo
25922, 35218	<i>Escherichia coli</i>
25923, 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>
49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
29212, 51299	<i>Enterococcus faecalis</i>
700327	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
700323	<i>Enterobacter cloacae</i>
90028	<i>Candida albicans</i>

O CQI dos testes manuais de caracterização e identificação dos microrganismos encontra-se sumariado na tabela seguinte.

Tabela 1.B – CQI dos testes manuais de caracterização e identificação dos microrganismos.

Teste	Monitorização	Frequência
Coagulase (carta)	Controlo Negativo	Por teste
	ATCC	
Coagulase (tubo)	ATCC	
Indol	ATCC	Por kit
Oxidase	ATCC	
Optoquina	ATCC	
Nitrocefin	ATCC	
Slidex MRSA Detection	Controlo Negativo	Por teste
	ATCC	Por kit
Slidex Strepto Plus	Controlo Positivo	Por teste
	ATCC	
API NH	ATCC	Por kit
ATB Haemo	ATCC	

O CQI dos testes manuais de detecção dos microrganismos nos produtos biológicos inclui controlos internos, indicados na tabela seguinte.

Tabela 1.C – CQI para os testes manuais de detecção dos microrganismos nos produtos biológicos.

Teste	Monitorização	Frequência
BinaxNOW (<i>Legionella</i>)	Controlo Interno (Negativo, Positivo)	Por teste
BinaxNOW (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	Controlo Interno (Negativo, Positivo)	
Duo Toxin A+B-Check-1	Controlo Interno	
One-Step FOB	Controlo Interno	
Vikia Rota-Adeno	Controlo Interno	

1.1.2 Imunologia

Na valência de Imunologia, o CQI abrange todos os parâmetros analisados. Consiste na utilização de materiais de referência de propriedades conhecidas, analisados nas mesmas condições que as amostras. O critério de aceitação dos resultados obtidos consiste nos intervalos de referência fornecidos por cada lote de controlo. Nas tabelas seguintes encontram-se os níveis e frequência de utilização de cada controlo, por metodologia e aparelho.

Tabela 1.D – CQI para os parâmetros determinados por quimioluminescência no Immulite 1000.

Parâmetro	Monitorização (níveis)	Frequência
Tiroglobulina	3	Quando há amostras
Calcitonina	2	
Desoxipiridinolina	2	
Osteocalcina	2	
Hormona do Crescimento	3	
Herpes Vírus Simplex 1/2 IgG	Negativo, Positivo	

Tabela 1.E – CQI para os parâmetros determinados por quimioluminescência no Immulite 2000.

Parâmetro	Monitorização (níveis)	Frequência
IgE total*	2	
Rastreio de IgE contra alérgenos inalantes	Negativo, Positivo	
Rastreio de IgE contra alérgenos alimentares e IgE específicas de alérgenos	2	Diária (1 nível)
Anticorpo anti-tiroglobulina*	2	
Anticorpo anti-peroxidase*	2	
Testosterona total*	3	
Androstenediona*	3	
Proteína A do plasma associada à gravidez	2	Semanal (amostras 1x/semana)
β-HCG livre	3	(2 níveis)
Estriol livre	3	
Insulina	2	
Hormona adrenocorticotrófica	2	Diária (1 nível)
Ácido fólico*	3	
Vitamina B12*	3	

* Está, actualmente, a ser adoptado um programa de avaliação externa do controlo interno (sistema Unity RealTime, Bio-Rad), para os parâmetros assinalados. Os resultados obtidos são comparados, em tempo real, com a média do grupo (conjunto de laboratórios que utilizam, simultaneamente, os controlos da Bio-Rad do mesmo lote), e é calculado o erro total admissível para cada parâmetro. Estas informações encontram-se disponíveis para consulta dos laboratórios participantes.

Tabela 1.F – CQI para os parâmetros determinados por quimioluminescência no Architect i2000_{SR}.

Parâmetro	Monitorização	Frequência
Hepatite A	IgM	Negativo, Positivo
	IgG	Negativo, Positivo
Hepatite B	Ag HBs	Negativo, Positivo
	Ag HBe	Negativo, Positivo
	Ac HBs	Negativo, Positivo 1 e 2
	Ac HBc	Negativo, Positivo
	Ac HBc IgM	Negativo, Positivo
	Ac HBe	Negativo, Positivo
		Diário (1 nível)
Hepatite C	Ac HCV	Negativo, Positivo
HIV	Ag/Ac	Negativo, Positivo 1, 2 e 3
Toxoplasmose	IgM	Negativo, Positivo
	IgG	Negativo, Positivo 1 e 2
Rubéola	IgM	Negativo, Positivo
	IgG	Negativo, Positivo 1 e 2
SCC	3 níveis	
Cyfra 21-1	3 níveis	Quando há amostras
Cortisol urinário	3 níveis	

Tabela 1.G – CQI para os parâmetros determinados por quimioluminescência no Liaison.

Parâmetro		Monitorização	Frequência
Renina		2 níveis	
Herpes Vírus Simplex 1/2	IgM	Negativo, Positivo	
Vírus Varicela-Zona	IgM	Negativo, Positivo	
	IgG	Negativo, Positivo	
Citomegalovírus	IgM	Negativo, Positivo	
	IgG	Negativo, Positivo	
Vírus de Epstein-Barr	EBV IgM	Negativo, Positivo	Diária (1 nível)
	VCA IgG	Negativo, Positivo	
	EBNA IgG	Negativo, Positivo	
Rubéola	IgM	Negativo, Positivo	
Enolase específica dos neurónios		2 níveis	
Rastreio ANA		Negativo, Positivo	
Autoanticorpos anti-cardiolipina	IgM	Negativo, Positivo	
	IgG	Negativo, Positivo	

Tabela 1.H – CQI para os parâmetros determinados por radioimunoensaio.

Parâmetro	Monitorização	Frequência
Testosterona livre	2 níveis	
Aldosterona	2 níveis	Quando há amostras
17- α -hidroxi progesterona	1 nível	
Anticorpos anti-receptor da TSH	Negativo, Positivo	

Tabela 1.I – CQI para os parâmetros determinados por técnicas manuais no âmbito da auto-imunidade.

Parâmetro	Monitorização	Frequência
Perfil ANA	Controlo Interno (Positivo)	
Perfil Mitocôndrias	Controlo Interno (Negativo, Positivo)	Por teste
Perfil Nucleossomas+Histonas	Controlo Interno (Negativo, Positivo)	
Waller-Rose	Negativo, Positivo	

Tabela 1.J – CQI para os parâmetros determinados por técnicas manuais no âmbito do diagnóstico serológico de infeções (material de controlo (soros) fornecido em cada kit de teste).

Parâmetro	Monitorização	Frequência
<i>Chlamydia</i> spp. IgG	Negativo, Positivo	
<i>Chlamydia</i> spp. IgM	Negativo, Positivo	
<i>Chlamydia</i> spp. IgA	Negativo, Positivo	
RPR	Negativo, Positivo	Por teste
TPHA	Negativo, Positivo	
Equinococose	Negativo, Positivo	
Doenças Febris	Widal, Weil-Felix	Negativo, 4 Positivos
	Rosa Bengala	Positivo

Tabela 1.K – CQI para os parâmetros determinados por técnicas manuais de imunocromatografia.

Parâmetro	Monitorização	Frequência
Mononucleose Infecciosa	Controlo Interno	Por teste
Teste de Gravidez	Controlo Interno	

Tabela 1.L – CQI para os parâmetros determinados no Hydrasis.

Parâmetro	Monitorização (níveis)	Frequência
Proteínas do soro	Controlo normal	Por corrida
Hemoglobinas	Controlo com variantes da Hb	

1.1.3 Hematologia

Na valência de Hematologia, o CQI abrange todos os parâmetros determinados por sistemas automatizados, e encontra-se representado na tabela seguinte.

Tabela 1.M – CQI para os parâmetros determinados por sistemas automatizados.

Aparelho	Parâmetro	Monitorização (níveis)	Frequência
Coulter LH750	Todos os parâmetros (excepto Reticulócitos)	3	Diária
	Reticulócitos	3	
Test 1 BCL	Velocidade de Sedimentação	3	
BCS	Todos	3	

1.2 AEQ

A AEQ constitui um método de avaliação do desempenho de um laboratório através de ensaios interlaboratoriais.

São fornecidas amostras controlo “cegas” por uma entidade externa. Estas amostras são testadas nas mesmas condições que as amostras dos pacientes, e os resultados são enviados à respectiva entidade. Esta avalia os resultados e elabora um relatório onde são comparados os resultados apresentados pelos vários laboratórios participantes. Face aos resultados, o laboratório poderá necessitar de aplicar medidas preventivas e/ou correctivas.

A AEQ permite avaliar de forma independente a qualidade técnica dos laboratórios, comparar resultados entre laboratórios, determinar o erro total admissível, controlar a exactidão e aumentar a confiança nos resultados obtidos.

No âmbito da AEQ, o laboratório participa nos seguintes programas:

- NEQAS – United Kingdom National External Quality Assessment Service;
- RIQAS – Randox International Quality Assessment Scheme;
- SEQC – Sociedade Espanhola de Química Clínica.

Nas tabelas seguintes encontram-se sumarizados os parâmetros avaliados por cada programa de AEQ, em cada valência.

Tabela 1.N – AEQ na valência de Microbiologia.

Programa	Parâmetros	Frequência
NEQAS	Bacteriologia geral (exame cultural, microscopia, colorações, identificação, susceptibilidade a agentes antimicrobianos)	Mensal
	Parasitologia fecal (microscopia, colorações)	
	Micobactérias (exame cultural, microscopia, colorações)	

Tabela 1.O – AEQ na valência de Imunologia.

Programa	Parâmetros	Frequência
RIQAS	IgE, Ácido Fólico, Vitamina B12, Testosterona, B-hCG livre, Estradiol, Insulina, Hormona do Crescimento, 17- α -hidroxiprogesterona	Quinzenal
SEQC	Electroforese das Proteínas do Soro (fracções albumina, α_1 -, α_2 -, β - e γ -globulinas), Ácido Fólico, Vitamina B12, Insulina, ACTH	Mensal

Tabela 1.P – AEQ na valência de Hematologia.

Programa	Parâmetros	Frequência
RIQAS	Contagem (Eritrócitos, Leucócitos, Plaquetas)	Quinzenal
	Índices Eritrocitários (Hemoglobina, Hematócrito, Volume Globular Médio, Hemoglobina Globular Média, Concentração de Hemoglobina Globular Média)	

CONCLUSÃO

Este estágio permitiu:

- Conhecimento da dinâmica de um laboratório de análises clínicas, com as vertentes comunitária e hospitalar;
- Integração nas equipas de trabalho de cada valência;
- Aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo da componente curricular do Mestrado em Análises Clínicas, em cada valência;
- Contacto com o percurso e processamento de diversos produtos biológicos;
- Manipulação de sistemas automatizados e semi-automatizados (incluindo manutenção, preparação, funcionamento e resolução de problemas);
- Manipulação de técnicas manuais;
- Execução de estratégias de controlo de qualidade e análise dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. FOTOGRAFIAS

- 1 [http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/ PPM_catalogue.pdf](http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/PPM_catalogue.pdf);
- 2 Fotografias da minha autoria, obtidas no estágio;
- 3 <http://www.microbiologyinpictures.com/mycobacterium%20tuberculosis.html>;
- 4 http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_HCP_HINF_GCR&doc=CNL_HCP_HINF_GCR_G_CHP_TXT_2&pubparams.sform=1&lang=en
- 5 http://www.biomerieux.com/servlet/srt/bio/portail/dynPage?open=PRT_NWS_REL&doc=PRT_NWS_REL_G_PRS_RLS_119&crptprm=ZmlsdGVyPQ==
- 6 <http://www.hivguidelines.org/clinical-guidelines/adults/hepatitis-b-virus/>
- 7 <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha-amino-acid-condensed-2D-flat.png>
- 8 Instruções de utilização “Hydragel 54 Protein”
- 9 Carrer D. Serum Protein Electrophoresis & Immunofixation – Illustrated Interpretations. Editions FM-BIO, 2005
- 10 Instruções de utilização “Hydragel 15 Hemoglobin”
- 11 <http://comediaeciencia.blogspot.com/2008/04/aprenda-fazer-um-esfregao-de-sangue.html>
- 12 <http://medicinembbs.blogspot.com/2011/02/normal-hemostasis.html>

2. LIVROS

- Cooper G. Basic Lessons in Laboratory Quality Control. Bio-Rad Laboratories, Inc.

Microbiologia

- Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. Jawetz, Melnick & Adelberg’s Medical Microbiology, 24th Ed. McGraw-Hill; 2004
- Struthers J, Westran R. Clinical Bacteriology. Manson Publishing Ltd; 2003
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 82-87

Imunologia

- Caquet R. Guia Prático de Análises Clínicas. Climepsi Editores; 2004
- Carrer D. Serum Protein Electrophoresis & Immunofixation – Illustrated Interpretations. Laboratoires Sebia
- Keren D. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. Edward Arnold Publishers Ltd; 2003
- Kindt T, Goldsby R, Osborne B. Kuby Immunology, 6th Ed. W. H. Freeman and Company; 2007
- McPhee S, Ganong W. Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine, 5th Ed. McGraw-Hill; 2006
- Pinto A. Fisiopatologia – Fundamentos e Aplicações. Lidel; 2009
- Shownfeld Y, Abreu I, Branco J. Doenças Autoimunes. Bio-Rad Laboratories, Inc.
- Sousa M. Os ANA no Diagnóstico Laboratorial das Doenças Autoimunes. Centro de Medicina Laboratorial Dr. Germano de Sousa; 2009

Hematologia

- Bain B. Células Sanguíneas: Um Guia Prático, 2ª Ed. Artes Médicas; 1997
- Bell A, Sallah S. The Morphology of Human Blood Cells, 7th Ed. Abbott Laboratories; 2005
- Casas A, Salve M, Amich S, Prieto S. Laboratorio de Hematología. McGraw-Hill; 1994

3. WEBSITESMicrobiologia

- <http://www.bd.com/europe/>
- <http://www.binaxnow.com/>
- <http://www.biomerieux-diagnostics.com/>
- <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
- <http://www.medipedia.pt/home/home.php?module=artigoEnc&id=222>
- <http://www.medipedia.pt/home/home.php?module=artigoEnc&id=300>

Imunologia

- <http://international.abbottdiagnostics.com/>
- <http://www.bio-rad.com/>
- <http://www.hepatitisbviruspage.com/>
- <http://www.medical.siemens.com/>
- <http://www.medipedia.pt/home/home.php?module=artigoEnc&id=278>
- <http://www.rsrltd.com/>
- http://www.roche.pt/hepatites/tabela_hepatite_b.pdf
- <http://www.sebia.com/>
- <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/index.htm>
- <http://www.hivguidelines.org/clinical-guidelines/adults/>

Hematologia

- <http://www.medical.siemens.com/>
- <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/index.htm>

4. FOLHETOS INFORMATIVOSMicrobiologia

- ATCC Genuine Cultures – Quality Control Strains. LGC Standards, disponível em <http://www.lgcstandards-atcc.org/Portals/5/PDF/qcsck.pdf>
- Complete culture media range. bioMérieux, disponível em http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/PPM_catalogue.pdf
- ESBL-producing Escherichia coli in the Community: An Emerging Public Health Threat. bioMérieux, disponível em http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Newsletter_BESMART.pdf
- Identification of Enterobacteriaceae. Health Protection Agency, disponível em <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsopid/pdf/bsopid16.pdf>
- Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Research Materials. LGC Standards, disponível em http://www.lgcstandards-atcc.org/Portals/5/mrsa_brochure.pdf

Imunologia

- Alergia e Imunologia. Phadia
- Autoimunidade Laboratorial – Caderno Nº1. Phadia
- Tavares-Neto, J. Gazeta Médica da Bahia. 2006;76(S1):19-22
- Hepatitis Learning Guide. Abbott Laboratories

5. OUTROSMicrobiologia

- Aulas de Bacteriologia Clínica do MACIII
- Instruções de utilização e fundamento teórico dos kits de testes rápidos e meios de cultura

Imunologia

- Aulas de Bioquímica Clínica I e II, Patologia Geral e Semiologia Laboratorial, Parasitologia Clínica e Virologia Clínica do MACIII
- Instruções de utilização e fundamento teórico dos testes semi-automatizados e manuais
- Instruções de utilização e fundamento teórico dos kits (Immulite 1000 e 2000, Architect i2000SR, Liaison, Sebia)
- Manual do Operador (Immulite 1000 e 2000, Architect i2000SR, Liaison, Sebia)

Hematologia

- Aulas de Hematologia I e II do MACIII
- Instruções de utilização e fundamento teórico dos kits (BCS)
- Manual do Operador (Coulter LH750, Test 1 BCL, BCS)

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



MONOGRAFIA
INFECÇÕES URINÁRIAS NA COMUNIDADE

ORIENTAÇÃO:
Professora Doutora Aida Duarte

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Filipa Antunes da Fonseca

LISBOA, 2011

RESUMO

As infecções do tracto urinário (ITUs) são as infecções bacterianas mais comuns, quer ao nível da comunidade, quer a nível hospitalar. Constituem uma grave ameaça à saúde devido à elevada incidência de ITUs de repetição e ao aumento da resistência aos antibióticos.

As mulheres possuem várias características que as tornam o grupo mais susceptível a ITUs, e é importante distinguir mulheres pré-menopausa, grávidas e pós-menopausa. O risco de ITU é elevado em subpopulações específicas incluindo crianças, idosos, indivíduos com lesões na espinal medula e/ou algaliados, indivíduos diabéticos, com esclerose múltipla ou imunodeprimidos, e ainda indivíduos com anomalias no tracto urinário.

A patogénese das ITUs é complexa e resulta da interacção entre propriedades dos microrganismos uropatogénicos, factores genéticos, comportamentais e biológicos do hospedeiro assim como defesas constitutivas e imunitárias deste.

Escherichia coli é o agente etiológico mais frequente, pois apresenta diversos mecanismos de virulência que lhe permitem invadir e colonizar o tracto urinário, e nele persistir, pois tem a capacidade de formar comunidades intracelulares resistentes às defesas do hospedeiro e às antibióterapias.

As ITUs mais frequentes são não complicadas e geralmente de fácil tratamento. No entanto, o aumento da resistência às antibióterapias adoptadas dificulta este tratamento. Na gestão de ITUs complicadas é importante a identificação e o estudo do perfil de susceptibilidade da estirpe em causa, assim como a caracterização da alteração/patologia subjacente.

Foram desenvolvidos dois estudos com o objectivo de conhecer a etiologia de ITUs na comunidade, assim como a susceptibilidade destas estirpes a antibióticos, em 2010 em Portugal. Os resultados demonstram a predominância de *Escherichia coli* assim como o aumento gradual da resistência das várias estirpes uropatogénicas aos antibióticos.

É importante o conhecimento dos perfis de susceptibilidade dos microrganismos mais frequentes em cada comunidade para que seja possível tomar decisões empíricas correctamente, evitando contribuir para o aumento das resistências.

Palavras-chave: Infecção do tracto urinário, comunidade, grupos de risco, patogénese, etiologia, antibióterapia

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are the most common bacterial infections in the community as well as in the nosocomial setting. These infections constitute a serious threat to human health due to high recurrence rates and the increase of antibiotic resistance.

These infections mainly affect women, and it's important to distinguish between premenopausal, pregnant and postmenopausal women. Other than women, specific subpopulations are at increased risk of UTI, including children, the elderly, people with spinal cord injuries and/or urinary catheters, people with diabetes, multiple sclerosis or immunodeficiencies, and people with underlying urinary tract abnormalities.

The pathogenesis of UTIs is complex and results from the interaction between the properties of the infecting uropathogens and host's genetic, behavioral and biologic characteristics as well as constitutive and immunitary defenses.

Escherichia coli is the predominant uropathogen, as it possesses several virulence mechanisms that enable the invasion and the colonization of the urinary tract. These bacteria have the ability to persist in the urinary tract through the formation of intracellular communities that resist to host's immunitary defenses and to antibiotics.

Uncomplicated UTIs are the most common bacterial infections and are usually of easy treatment. However, increasing antibiotic resistance complicates this treatment. The management of complicated UTIs requires the characterization of the infecting uropathogen and of the underlying disease and/or urinary tract abnormality.

Two studies were developed with the purpose of knowing the etiology of community-acquired UTIs as well as the susceptibility to antibiotics of the most common uropathogens, in 2010 in Portugal. The results show *Escherichia coli* as the most common uropathogen and the gradual increase of antibiotic resistance.

It's important to know the susceptibility profiles of each community's most common uropathogens to make correct empiric treatment decisions, as to avoid contributing to the increase of antibiotic resistance.

Keywords: Urinary tract infection, community, risk groups, pathogenesis, etiology, antibioterapy

INTRODUÇÃO

As infecções do tracto urinário (ITUs) encontram-se entre as infecções mais frequentes no homem (1, 2, 3). As ITUs de etiologia bacteriana adquiridas na comunidade ou em cuidados de saúde são, inclusivamente, consideradas as infecções mais prevalentes (2, 3, 4, 5, 6).

Estima-se que a maioria das mulheres sofre pelo menos uma ITU em toda a sua vida, e uma grande parte sofre ITUs de repetição (1, 2, 4, 7, 8). Outros grupos afectados incluem as crianças e os idosos, entre outros (1, 2, 9, 10). Várias patologias aumentam a incidência de ITUs, nomeadamente diabetes *mellitus*, esclerose múltipla e HIV (2, 9, 11, 12).

Numa situação fisiológica, o tracto urinário e a urina são estéreis. Uma ITU consiste numa resposta inflamatória do tracto urinário à presença de microrganismos. É caracterizada pela presença e multiplicação de microrganismos no tracto urinário e na urina, associadas à presença de leucócitos que reflectem essa resposta inflamatória (2, 3, 10, 27).

O diagnóstico laboratorial de uma ITU requer um exame microbiológico cultural positivo (com um título de 10^5 UFC/mL, em casos não associados a factores de risco), caracterizado pelo crescimento de um tipo de colónias (ou de mais do que um tipo de colónias, mas com prevalência de um dos tipos) associado à observação de leucócitos no exame microscópico a fresco e dos microrganismos correspondentes no exame microscópico corado por Gram. A presença de leucócitos na urina associada a uma cultura negativa, apesar de indicar uma inflamação, não é suficiente para evidenciar uma ITU (3, 8, 9, 10, 13, 28).

Geralmente, as ITUs não complicadas são consideradas benignas, raramente causando sequelas a longo prazo, enquanto que as ITUs complicadas estão associadas a maior morbilidade. No entanto, mesmo as ITUs não complicadas encontram-se associadas a uma morbilidade considerável incluindo uma média de 6.1 dias de sintomas, 2.4 dias de actividade restrita e 0.4 dias acamados. O facto de serem infecções bastante frequentes, associado aos custos da intervenção médica necessária na maioria dos casos, leva a que as ramificações financeiras destas infecções sejam significativas (2).

A fronteira entre o comensalismo e a virulência resulta de um equilíbrio entre factores fisiológicos e estruturais inerentes ao hospedeiro e a presença e expressão de factores de virulência pelos microrganismos patogénicos (5).

Para a gestão óptima de uma ITU é essencial conhecer o local de infecção, se a infecção é não complicada ou complicada, recorrente ou recidiva, a sua patogénese e os factores de risco associados. O prognóstico e o tratamento de uma ITU dependem do microrganismo que a causa, do local onde ocorre e de factores de predisposição do hospedeiro (3, 9).

1. CLASSIFICAÇÃO

As ITUs são classificadas de acordo com vários critérios (14), nomeadamente:

- Local de infecção – cistite ou pielonefrite;
- Estado do tracto urinário – não complicadas ou complicadas;
- Estado do paciente – sintomáticas ou assintomáticas;
- Padrão de infecção – isoladas ou de repetição (recorrentes ou recidivas).

1.1 Cistite e Pielonefrite

A cistite é um processo inflamatório que ocorre no tracto urinário inferior, nomeadamente ao nível da bexiga, e os seus sintomas mais característicos são disúria, urgência miccional, polaquiúria, dor suprapúbica e hematúria (1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 15, 27). Raramente adquire um carácter mais grave, sendo a cura espontânea em 80% dos casos (1, 2, 10, 27). Afecta principalmente o sexo feminino, devendo ser diferenciada entre mulher pré-menopausa, grávida ou pós-menopausa (14). Corresponde a 95% das ITUs sintomáticas (5).

A pielonefrite aguda é um processo inflamatório que ocorre no tracto urinário superior, nomeadamente ao nível dos rins, no parênquima renal. É acompanhada de arrepios de frio, febre alta, dor abdominal e lombar, disúria, urgência miccional, polaquiúria, náuseas e vómitos (1, 2, 3, 4, 8, 10, 15). Um quadro de pielonefrite varia entre uma cistite acompanhada de lombalgia ligeira e uma situação de sépsis (1). As consequências ao nível da função renal podem ser graves e a ausência de antibioterapia pode ser mortal (27).

A pielonefrite crónica é caracterizada pela atrofia do rim que se torna pequeno, contraído e cheio de cicatrizes. Esta situação é normalmente provocada por infecção bacteriana recente ou passada. É geralmente assintomática excepto se envolver os dois rins, podendo resultar em insuficiência renal crónica (27).

1.2 ITU não complicada e ITU complicada

Uma ITU diz-se não complicada quando ocorre num tracto urinário normal, sem anomalias funcionais ou estruturais, nem algaliação prévia à infecção (1, 2, 3, 5, 14). Uma ITU diz-se complicada quando é diagnosticada num tracto urinário que apresenta anomalias funcionais e/ou estruturais, incluindo a algaliação, ou quando existem patologias subjacentes que

predis põem o indivíduo para o desenvolvimento de ITUs, como a diabetes *mellitus* e a infecção por HIV, ou seja, quando estão reunidas condições que tornam o hospedeiro mais susceptível ao desenvolvimento de uma ITU e que favorecem o estabelecimento dos microrganismos por interferência com a micção (1, 2, 3, 5, 8, 9, 14). Consideram-se ainda ITUs complicadas as infecções provocadas por microrganismos que apresentam multi-resistências aos antibióticos, e as ITUs que ocorrem no sexo masculino, pois é anatomicamente mais difícil a penetração dos microrganismos no tracto urinário dos homens, sendo infecções mais raras (8, 14, 16).

Normalmente as ITUs da comunidade são consideradas não complicadas enquanto que as ITUs nosocomiais são consideradas complicadas (6).

1.3 ITU sintomática e Bacteriúria assintomática

As ITUs são sintomáticas quando a presença de microrganismos uropatogénicos no tracto urinário estimula a libertação de citocinas, resultando numa resposta inflamatória sintomática (16). Casos de bacteriúria assintomática são identificados pelo isolamento de concentrações significativas, consistentes com infecção, de microrganismos na urina, não associadas a sinais ou sintomas locais ou sistémicos de infecção (2, 5, 8, 15).

1.4 ITU de repetição

Por fim, quando o mesmo indivíduo, geralmente do sexo feminino, sofre três ou mais ITUs no mesmo ano ou duas ou mais em seis meses, estas são referidas como ITUs de repetição (8). Podem ser classificadas como recorrentes ou recidivas (2, 17). As ITUs recorrentes ocorrem repetidamente após a antibioterapia e são provocadas por microrganismos distintos dos isolados antes da antibioterapia, resultando geralmente de uma nova infecção por via ascendente. As recidivas ocorrem repetidamente devido ao mesmo microrganismo que se revela, frequentemente, resistente à antibioterapia, e requerem um estudo mais profundo do tracto urinário, superior e inferior, pois existem muitas causas possíveis para estas situações, e alguns exemplos são cálculos renais infectados, cistocelo, cateteres urinários, entre outros (2, 3, 8, 17). Geralmente, os indivíduos que sofrem ITUs complicadas sofrem também ITUs de repetição. Neste caso, a frequência de re-infecção depende da alteração ou patologia subjacente, e pode ser recorrente ou recidiva (9).

2. GRUPOS DE RISCO

As ITUs podem ocorrer em qualquer pessoa, mas é possível distinguir sub-populações que se encontram sob maior risco, como é o caso de crianças, mulheres, idosos, indivíduos algaliados, com lesões na espinal medula, diabéticos, com esclerose múltipla, imunodeprimidos (HIV), e ainda indivíduos cujo tracto urinário apresente anomalias funcionais e/ou estruturais (2).

2.1 Crianças

A epidemiologia das ITUs durante a infância varia com a idade, género e outros factores. A incidência das ITUs é maior no primeiro ano de vida para todas as crianças, diminuindo depois nos rapazes em comparação com as raparigas, principalmente se for realizada a circuncisão (2, 3, 10). As crianças caucasianas apresentam maior incidência de ITUs do que as crianças negras (10).

É reconhecida, cada vez mais, a importância das ITUs nas crianças, principalmente como causa oculta de febres de origem desconhecida. Alguns estudos demonstram que cerca de 5% das crianças com menos de 2 anos que se dirigem às urgências com febre apresentam ITU, e que cerca de metade seria mal diagnosticada se não fossem recolhidas amostras de urina (10).

Cerca de 3% das raparigas e de 1% dos rapazes sofrem uma ITU antes da puberdade. As raparigas que sofrem ITUs de repetição têm maior probabilidade de sofrer lesões renais o que constitui um maior risco de doença renal crónica na idade adulta (2).

Nestas idades, a principal via pela qual ocorre a infecção é a via ascendente. A suspeita de ITU em crianças surge na presença de disúria, polaquiúria, urgência e dor suprapúbica e abdominal. Em crianças mais pequenas por vezes verificam-se sintomas inespecíficos como falta de apetite, vómitos, irritabilidade, icterícia (em recém-nascidos), ou febre (10).

2.2 Sexo feminino

As cistites não complicadas ocorrem predominantemente em mulheres jovens, saudáveis, não grávidas e sem anomalias do tracto urinário (2, 4, 7). Estima-se que uma em cada três mulheres sofrerá uma ITU com necessidade de tratamento antibacteriano até aos 24 anos (2, 7). O pico de incidência destas infecções ocorre em mulheres sexualmente activas, de 18-39

anos (7). Cerca de 50-60% das mulheres sofrerá pelo menos uma ITU durante a sua vida, cerca de 30-40% irá sofrer pelo menos uma ITU de repetição, e cerca de 25% e 3% das mulheres jovens tem tendência para sofrer uma segunda e uma terceira ITU, respectivamente, durante os seis meses que sucedem a antibióterapia (1, 2, 4, 7, 8).

A maioria das ITUs não complicadas em mulheres não pode ser explicada por anomalias estruturais e/ou funcionais do tracto urinário, mas encontram-se já identificados vários aspectos biológicos e comportamentais que parecem predispor as mulheres para o desenvolvimento de ITUs. Um deles é a história clínica prévia de ITU (16).

As mulheres são mais susceptíveis ao desenvolvimento deste tipo de infecções do que os homens, uma vez que a uretra da mulher é mais curta e encontra-se mais perto do vagina e do ânus, enquanto que no homem verifica-se uma maior produção de secreções antibacterianas, nomeadamente as secreções prostáticas, e a uretra é mais longa e encontra-se num ambiente mais seco (2, 5, 14, 16).

As relações sexuais associadas ao uso de espermicidas e de diafragmas são os principais factores de predisposição para o desenvolvimento de ITU em mulheres jovens (2, 3, 5, 8, 16). As relações sexuais aumentam o risco de ITU devido à introdução mecânica de agentes uropatogénicos na bexiga ou a um efeito de trauma (16). O uso de espermicidas causa a diminuição da concentração de *Lactobacillus* da flora vaginal, principalmente as estirpes produtoras de peróxido de hidrogénio, reduzindo a resistência que estas estirpes oferecem à colonização vaginal por agentes uropatogénicos, e ainda à vaginose bacteriana e à candidose (5, 16). Por outro lado, a frequência das relações sexuais aumenta a probabilidade de desenvolvimento de ITUs (2). Algumas antibióterapias podem também predispor as mulheres jovens para ITUs pois alteram a flora vaginal, inibindo a sua resistência à colonização por microrganismos uropatogénicos (16).

Os estrogénios parecem predispor este grupo ao desenvolvimento de ITUs mas o mecanismo pelo qual actuam é ainda pouco claro. Alguns estudos indicam que os estrogénios facilitam a adesão dos microrganismos uropatogénicos às células vaginais e uroepiteliais (16).

Cerca de 20% das mulheres jovens sofrem ITUs de repetição. Estas encontram-se, normalmente, associadas a factores comportamentais que incluem a frequência das relações sexuais, o uso de espermicidas, a alteração de parceiro sexual, entre outros. Uma grande parte destas ITUs resulta de re-infecção por microrganismos da flora intestinal, sendo rara a presença de anomalias do tracto urinário. Mulheres que sofreram ITUs quando eram crianças,

ou cujas mães apresentam história de ITUs, têm um risco mais elevado de sofrer ITUs de repetição. Isto sugere que a hereditariedade de algumas características pode ser importante em algumas mulheres que sofrem ITUs de repetição. É o caso dos fenótipos secretor e não secretor dos antígenos do grupo sanguíneo. Vários estudos indicam que os microrganismos uropatogénicos, nomeadamente *Escherichia coli*, aderem melhor ao uroepitélio de mulheres de fenótipo não secretor, e por isso estas mulheres têm maior probabilidade de sofrer ITUs de repetição. Pensa-se que a melhor adesão dos microrganismos se deva à presença de receptores glicolipídicos que são expressos à superfície das células uroepiteliais de mulheres de fenótipo não secretor (16).

2.3 Gravidez

As ITUs constituem as principais infecções bacterianas durante a gravidez e a pielonefrite constitui uma complicação grave muito frequente durante este período, relacionada como o nascimento de crianças com baixo peso, partos prematuros e morte fetal (2, 3, 8). Mulheres com história clínica de ITUs apresentam um maior risco de desenvolvimento de ITUs durante a gravidez, e os factores de risco mais frequentemente associados ao desenvolvimento de cistites ou de bacteriúria assintomática durante este período são o baixo nível sócio-económico, anemia falciforme, paridade, gravidez em idades mais avançadas, e cuidados médicos deficientes durante a gravidez. Anomalias do tracto urinário ou diabetes *mellitus* aumentam também a susceptibilidade para ITU neste período (2).

Cerca de 1-4% das mulheres desenvolvem cistite aguda pela primeira vez durante a gravidez e cerca de 4-10% das mulheres grávidas são diagnosticadas com bacteriúria assintomática (2). Devem ser realizados rastreios para bacteriúria assintomática durante a gravidez pois, na ausência de tratamento, esta pode evoluir para pielonefrite aguda, anemia e pré-eclampsia (2, 3). Consequências para os recém-nascidos incluem paralisia cerebral e atraso mental (2).

São vários os factores fisiológicos que predispõem uma mulher ao desenvolvimento de ITU, bacteriúria assintomática ou pielonefrite durante a gravidez. Um deles consiste nos efeitos hormonais da progesterona, que conduz à dilatação da uretra e a movimentos peristálticos mais lentos. Pode ocorrer refluxo vesico-uretral e o útero pressiona os ureteres. A mucosa da bexiga encontra-se hiperemiada e edematosa. Estas alterações podem provocar polaquiúria, noctúria e incontinência (8).

2.4 Menopausa

As modificações fisiológicas resultantes da menopausa, que incluem a alteração da flora vaginal, resultam num aumento do pH e numa diminuição do glicogénio vaginais (8). Como já foi referido, os estrogénios parecem facilitar as ITUs em mulheres jovens. No entanto, a deficiência de estrogénios em mulheres pós-menopausa parece, pelo contrário, facilitar as ITUs, e o risco parece diminuir através da administração de estrogénios, por estimular a multiplicação de *Lactobacillus* e normalizar a flora vaginal (14, 16). Alguns autores concluíram que a reposição do estrogénio em mulheres pós-menopausa promove o reaparecimento de *Lactobacillus* da flora vaginal e a diminuição do pH vaginal, levando a uma diminuição do crescimento dos agentes uropatogénicos e, conseqüentemente, do desenvolvimento de ITUs (8, 14).

Alguns estudos indicam que, em contraste com os factores comportamentais predominantemente relacionados com ITUs de repetição em mulheres pré-menopausa, os factores estruturais e/ou funcionais que afectam o esvaziamento da bexiga estão intimamente relacionados com as ITUs de repetição em mulheres pós-menopausa. Estes factores incluem a incontinência urinária, a história clínica de ITUs antes da menopausa e o fenótipo não secretor (16).

2.5 Sexo masculino

As ITUs são raras em homens adultos de 15-50 anos, ocorrendo com maior frequência em recém-nascidos, crianças e idosos. Como já foi referido, as ITUs que afectam este grupo são normalmente consideradas como resultado de anomalias do tracto urinário, incluindo anomalias estruturais, obstrução da bexiga ou algaliação (14).

Nos homens jovens, os principais factores de risco incluem relações sexuais com mulheres colonizadas na vagina com agentes uropatogénicos, homossexualidade e ausência de circuncisão (3, 14, 16).

As estirpes que afectam este grupo tendem a ser muito virulentas (5, 16).

2.6 Idosos

As ITUs são infecções muito frequentes em indivíduos idosos e são geralmente consideradas complicadas (2, 9). Em indivíduos não institucionalizados, as ITUs não complicadas correspondem a 25% das infecções. São vários os factores que predispõem os idosos para o desenvolvimento de ITUs, incluindo doenças crónicas, anomalias funcionais do tracto urinário e antibióterapias específicas (2).

A incidência de bacteriúria assintomática nos idosos (idades superiores a 70 anos) é mais elevada no sexo feminino (50%) do que no sexo masculino (30%), quer em indivíduos que vivem independentemente quer em indivíduos institucionalizados. Cerca de 11-25% dos indivíduos idosos não algaliados desenvolvem bacteriúria assintomática que geralmente se resolve sem grandes complicações e sem necessidade de antibióterapia. No entanto, infecções provocadas por bactérias produtoras de urease como *Proteus* spp. podem ter consequências muito graves, incluindo a formação de cálculos e lesões renais permanentes (2).

No sexo masculino uma das causas mais frequentes de ITU é a hipertrofia da próstata que causa obstrução e fluxo turbulento da urina, enquanto que no sexo feminino os principais factores de risco incluem uropatias obstrutivas, prolapso genital e cistocelo, incontinência fecal e algaliação (8, 9, 16).

As doenças neuronais degenerativas crónicas como a doença de Alzheimer e acidentes vasculares cerebrais são frequentemente acompanhados de bexiga neurogénica, constituindo factores de predisposição importantes dos idosos para ITUs (9).

2.7 Algaliação

O cateter urinário é um dispositivo médico muito útil que tem sido bastante utilizado quer de forma intermitente, quer de forma fixa (18). A algaliação é considerada de curta ou de longa duração quando o cateter urinário está colocado por um período inferior ou superior a 30 dias, respectivamente (9).

As ITUs associadas ao uso de cateter urinário constituem as infecções adquiridas em cuidados de saúde mais comuns em hospitais e lares (2, 8, 9, 13). Podem ser assintomáticas (90% dos casos). O risco de ITU aumenta com a duração do período de algaliação (2, 18). A razão mais comum para a algaliação de longa duração nos homens é a obstrução do tracto urinário e nas mulheres é a incontinência (9).

São vários os mecanismos pelos quais o uso do cateter urinário aumenta o risco de desenvolvimento de uma ITU:

- A introdução do cateter urinário pode levar ao arrastamento de microrganismos que se encontrem na uretra para o interior da bexiga;
- O tubo de drenagem deve ser aberto periodicamente para drenar urina acumulada, uma vez que, se este tubo estiver contaminado, os microrganismos têm a oportunidade de ascender ao cateter urinário, e consequentemente, à bexiga;
- Se a drenagem não for completa, a bexiga vai continuar a conter urina, oferecendo estabilidade aos microrganismos que lá se encontrem;
- Independentemente dos cuidados de manutenção do cateter urinário, o espaço entre este e a mucosa uretral constitui uma via directa de entrada para a bexiga (18).

Numa situação normal, o tracto urinário é capaz de eliminar facilmente qualquer bactéria que chegue à bexiga, enquanto que, numa situação de algaliação, os microrganismos vão ter a oportunidade de se multiplicar e atingir concentrações muito elevadas (18).

Simultaneamente, os microrganismos têm a capacidade de aderir à superfície do cateter urinário e produzir biofilmes, estabelecendo microambientes que os protegem das defesas do hospedeiro, do fluxo de urina e da antibioterapia (1, 18). Isto ocorre principalmente nos casos de algaliação de longa duração. Estes biofilmes são, normalmente, constituídos por bactérias, glicocálices bacterianos, proteínas de Tamm-Horsfall e sais da urina (9).

O cateter urinário pode ainda lesar o próprio epitélio com o qual está em contacto directo e, ao constituir um objecto estranho ao organismo, pode interferir com as funções do sistema imunitário do hospedeiro (18).

Uma vez introduzido o cateter urinário, verifica-se um aumento diário de 3-10% da prevalência de bacteriúria. A grande maioria dos indivíduos (78-95%) apresenta bacteriúria ao fim de 30 dias de algaliação (13, 18).

Para manter as condições de assépsia, alguns cuidados são (8, 9, 18):

- Instalar o cateter urinário apenas quando é mesmo necessário, evitar a sua manipulação e removê-lo o mais rápido possível;
- Substituir o cateter urinário em caso de suspeita de infecção;
- Usar sistemas colectores fechados e monitorizar o nível de urina no saco colector;
- Prender o cateter à coxa para que este não esforce a uretra;
- Ingerir 1,5 L ou mais de água por dia.

2.8 Lesões na espinal medula

O controlo neurológico da bexiga e dos seus esfíncteres depende do sistema nervoso e as lesões ao nível da espinal medula causam a alteração da dinâmica da micção provocando incontinência, pressão intravesical elevada, refluxo, cálculos e obstrução neurológica. É frequentemente necessário recorrer à algaliação nestes casos (2, 11, 13, 17).

Associado ao risco de infecção por microrganismos multi-resistentes devido à frequente exposição a agentes antimicrobianos, estas lesões conduzem ao aumento do risco de ITUs (2, 13). Os indivíduos mais frequentemente afectados são homens jovens (2). Estas ITUs são geralmente complicadas e associadas a mortalidade e morbilidade significativas, sendo que cerca de 40% dos indivíduos acabam por morrer devido a complicações renais (2, 13).

Para além dos sinais e sintomas de ITU já referidos, nestes indivíduos verifica-se também incontinência urinária, aumento da espasticidade e da transpiração, hiperreflexia da bexiga, e urina turva ou com odor forte (9, 13, 17). Os indivíduos podem não manifestar sintomas irritativos devido à lesão dos seus terminais nervosos (9). O significado da piúria nestes indivíduos é muitas vezes incerto, uma vez que pode resultar do efeito irritativo do cateter urinário no epitélio da bexiga ou da invasão das células epiteliais do hospedeiro (13, 17). Verifica-se também que as bactérias Gram-negativas provocam maior piúria do que as bactérias Gram-positivas (17).

2.9 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus é uma patologia que está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de várias infecções, sendo a mais prevalente a ITU (11). Está também associada a uma elevada tendência para ITUs de repetição (5).

Vários estudos epidemiológicos revelam um aumento de 1.21-2.2 no risco relativo de desenvolvimento de ITU em indivíduos diabéticos, quando comparados com indivíduos não diabéticos (2, 11). O risco de ITU está correlacionado com a duração e a gravidade desta patologia (9, 11). A prevalência de bacteriúria assintomática em mulheres diabéticas é três vezes superior à prevalência em mulheres não diabéticas, mas não parece aumentar a prevalência em homens diabéticos (2, 9, 11).

As ITUs que ocorrem em indivíduos diabéticos são consideradas complicadas. Aumentam a probabilidade de hospitalização para a terapêutica de pielonefrites, e a incidência de infecções bacterêmicas e de falência renal bilateral (2, 9).

Os mecanismos que contribuem para o aumento da susceptibilidade de indivíduos diabéticos para ITU incluem o aumento da concentração de glucose na urina, que facilita a multiplicação dos microrganismos, a depressão do sistema imune do hospedeiro, pois a migração, fagocitose e restantes funções dos leucócitos são afectadas, e a lesão dos terminais nervosos ao nível do tracto urinário, que leva à disfunção da micção e à retenção de urina (11). Por outro lado, nestes pacientes verifica-se uma redução marcada das glicoproteínas de Tamm-Horsfall, facilitando a adesão dos microrganismos, nomeadamente *Escherichia coli* (19).

Apesar da diferença de susceptibilidades entre as populações de indivíduos diabéticos e não diabéticos, a ITU em si parece apresentar uma patogénese semelhante, a mesma etiologia, e o mesmo tipo de consequências. No entanto, ainda não está esclarecido se a ITU em indivíduos diabéticos constitui uma acentuação dos processos que ocorrem em indivíduos não diabéticos, ou se constitui uma patologia distinta caracterizada por mecanismos diferentes, sendo necessários futuros estudos sobre a função da glicosúria, os defeitos ao nível das defesas imunitárias, e as ITUs em homens (11).

2.10 Esclerose Múltipla e HIV

O risco de ITU e de bacteriúria assintomática é relativamente elevado em indivíduos com esclerose múltipla (90% e 74%, respectivamente). Uma ITU precede frequentemente uma recaída da esclerose múltipla e as ITUs de repetição encontram-se associadas à exacerbação aguda e à progressão neurológica desta patologia (2, 9).

Os indivíduos seropositivos para HIV encontram-se em maior risco de contrair infecções oportunistas. Schönwald et al. realizaram uma análise retrospectiva e concluíram que os indivíduos seropositivos para HIV sofrem ITUs mais frequentemente do que indivíduos seronegativos para HIV (2, 12).

3. PATOGÉNESE / INTERACÇÃO HOSPEDEIRO-MICRORGANISMO

A patogénese de uma ITU é complexa e depende das propriedades de adesão, virulência e motilidade das bactérias que invadem o tracto urinário, de aspectos genéticos, biológicos e comportamentais do hospedeiro e ainda dos seus mecanismos de defesa (10, 16, 19, 27).

As principais vias através das quais se pode dar a invasão do tracto urinário são a via ascendente e a via hematogénea. A via ascendente é a que tem maior importância e consiste na invasão do tracto urinário por microrganismos provenientes da flora rectal (5, 8, 10, 15, 27). A via hematogénea é mais rara e encontra-se associada a situações em que há obstrução renal ou infecções sanguíneas (5, 8, 10, 16, 27).

A colonização vaginal por microrganismos da flora rectal é o primeiro requisito para se desenvolver uma ITU (5, 16, 17, 19). Depois, a sua evolução vai depender da interacção dinâmica entre o hospedeiro e os microrganismos uropatogénicos (16, 19, 20).

Alterações na concentração de *Lactobacillus*, principalmente as estirpes produtoras de peróxido de hidrogénio, têm um papel significativo na colonização vaginal por microrganismos uropatogénicos. Os factores que predis põem para a colonização vaginal também predis põem para a colonização da bexiga e ITU. No entanto, nem todos os casos de colonização vaginal evoluem para ITU. Pensa-se que a colonização vaginal seja um pré-requisito mas que seja necessário outro factor como, por exemplo, as relações sexuais, para que a ITU se desenvolva (16).

Os microrganismos colonizam depois a região distal da uretra, sendo muito importante a adesão ao seu epitélio. A colonização depende das características adesivas específicas de cada agente uropatogénico, dos receptores celulares que se encontram à superfície do epitélio do hospedeiro, e dos fluidos que os envolvem (19).

Após a colonização do epitélio da uretra, as bactérias começam a colonizar o epitélio da bexiga (3). Posteriormente, pode ocorrer a colonização dos rins através dos ureteres, e da próstata através dos ductos ejaculatórios (1, 3, 4).

Alguns microrganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Klebsiella pneumoniae*, apresentam ainda a capacidade de se internalizar no epitélio da bexiga (4).

3.1 Factores de risco

Os factores que aumentam a probabilidade de um indivíduo contrair uma ITU incluem factores genéticos, estruturais, funcionais e comportamentais (2).

3.1.1 ITUs não complicadas

Geralmente são considerados factores de risco para ITUs não complicadas todos aqueles que facilitam a colonização vaginal com microrganismos uropatogénicos ou que facilitam a sua penetração na bexiga (16). Incluem factores comportamentais, biológicos e genéticos, como a idade, gravidez, frequência das relações sexuais, uso de diafragmas, preservativos e espermicidas, micção tardia posterior à relação sexual, menopausa, história clínica de ITUs prévias e alguns antígenos de grupos sanguíneos. Após o uso de agentes antimicrobianos, verifica-se também uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de ITUs (2, 3, 5, 6, 8, 16).

3.1.2 ITUs complicadas

A patogénese de ITUs complicadas é multifactorial. As anomalias do tracto urinário e as patologias que predis põem o hospedeiro para este tipo de infecções podem ser temporárias ou permanentes. Incluem anomalias estruturais e/ou funcionais do tracto urinário que comprometem o fluxo da urina, como cálculos renais ou bexiga neurogénica, presença de corpos estranhos como cateteres, microrganismos multi-resistentes, imunossupressão, e patologias que dificultem a acção dos agentes antimicrobianos como a prostatite (2, 3, 6, 9, 13, 16).

Geralmente actuam promovendo a estase da urina, permitindo que os microrganismos uropatogénicos iludam as defesas normais do hospedeiro, comprometendo o sistema imunitário do hospedeiro, e permitindo a formação de nichos de difícil eliminação (8, 16). A obstrução do fluxo de urina interfere com os mecanismos de defesa da mucosa porque provoca distensão e causa acumulação e estase da urina. Os cateteres urinários constituem um acesso fácil dos microrganismos ao tracto urinário, e as fístulas constituem um acesso directo do intestino para o tracto urinário. Cálculos, biofilmes, e outros corpos estranhos permitem a formação de nichos de difícil eliminação que constituem um reservatório permanente de microrganismos (16).

Algumas patologias como lesões na espinal medula, diabetes *mellitus*, esclerose múltipla e HIV agravam as consequências das ITUs, sendo consideradas também como factores de risco para o desenvolvimento destas infecções (2, 8, 19).

A incidência de bacteriúria assintomática na população em geral é de cerca de 3.5%, com uma tendência para aumentar com a idade, e os principais factores de risco para esta situação incluem a paridade, diabetes *mellitus*, história clínica de ITUs prévias e nível educacional baixo (2).

3.2 Factores do meio

O tracto urinário é um nicho ecológico que possui factores estruturais e funcionais que interferem na patogénese das ITUs (3, 5).

A urina é um bom meio líquido de cultura para os microrganismos devido aos seus valores fisiológicos de pH e osmolaridade, e a um conjunto de nutrientes (glucose, aminoácidos e ácido úrico) óptimos para o seu crescimento, apesar de ser simultaneamente um meio pobre em ferro (5). No entanto, alguns componentes da urina, quando em elevadas concentrações, podem inibir este crescimento. É o caso da ureia e dos ácidos orgânicos (5, 8, 20).

3.3 Defesas constitutivas

O tracto urinário constitui uma forte barreira mecânica contra infecções, pois apresenta um conjunto de características anti-aderentes que dificultam a penetração e a sobrevivência de microrganismos uropatogénicos (20, 21).

O mecanismo constitutivo mais importante do hospedeiro é a drenagem da urina dos rins para a bexiga, que é esvaziada por micção periódica (9, 20). Esta previne a estase da urina, minimizando o risco de colonização, e condiciona a capacidade de multiplicação dos agentes uropatogénicos, evitando assim que se estabeleça na bexiga uma concentração significativa de microrganismos (3, 8, 20).

Os glicosaminoglicanos presentes do epitélio da bexiga assim como as proteínas de Tamm-Horsfall presentes no loop de Henle diminuem também a capacidade de adesão dos agentes uropatogénicos (3, 8, 20). As proteínas de Tamm-Horsfall estão envolvidas na activação do sistema do complemento e de células dendríticas por ligação às fímbrias do tipo 1 de *Escherichia coli* (22).

A adesão e a internalização no epitélio da bexiga activa a descamação e a apoptose das células, eliminando os microrganismos (1, 15, 20).

Outra estratégia consiste na redução da quantidade de ferro livre e disponível para os microrganismos, através da redução da absorção intestinal do ferro, do aumento da síntese de proteínas de transporte e de armazenamento de ferro, e da transferência de uma maior quantidade de ferro do plasma para o armazenamento intracelular (15).

O epitélio do tracto urinário produz ainda imunoglobulinas secretórias A (IgA) (20).

Ao nível da vagina, a flora comensal que engloba *Lactobacillus*, bactérias Gram-positivas, entre outros, e o baixo pH, inibem a migração de microrganismos da flora entérica para a bexiga (8).

3.4 Imunidade inata

A imunidade inata do hospedeiro tem como objectivos controlar a proliferação e a disseminação dos microrganismos e estimular a imunidade adaptativa. É activada quando as defesas constitutivas não conseguem impedir a adesão e colonização do uroepitélio. É bastante eficaz, conseguindo eliminar cerca de 99% dos microrganismos (20). Envolve respostas de várias células incluindo neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos NK, mastócitos e células dendríticas (1, 20).

As células da bexiga são capazes de reconhecer os padrões PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) que se encontram na superfície dos microrganismos e são conservados nas várias espécies (como os lipopolissacáridos e a camada do peptidoglicano), através de receptores celulares específicos (PRR – Pattern Recognition Receptors) pertencentes a várias famílias e presentes na superfície de várias células como leucócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas, linfócitos T, B e NK, e células epiteliais (1, 20, 21, 22).

A família de receptores que se encontra melhor caracterizada é a família TLR (Toll-Like Receptors) (1, 21). Os TLR encontrados no tracto urinário incluem os TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 e TLR11 (21).

O TLR2 reconhece as lipoproteínas e a camada de peptidoglicano (4, 21, 22). O TLR3 reconhece RNA em cadeia simples e/ou dupla bacteriano ou viral (21, 22). O TLR5, expresso na bexiga, reconhece a proteína flagelina, principal constituinte dos flagelos, e induz a síntese de moléculas pró-inflamatórias (4, 21, 22). O TLR9 reconhece DNA não metilado bacteriano

e viral (21). Recentemente foi descrito o TLR11, expresso nos rins, que reconhece perfis parasitários e estirpes uropatogénicas de *Escherichia coli* (1, 4, 21).

O TLR4 é o mais estudado e é expresso à superfície das células epiteliais da bexiga e dos rins, assim como o seu co-receptor CD14 (1, 4, 21). Este receptor constitui o componente sinal do complexo de reconhecimento dos lipopolissacáridos de bactérias Gram-negativas, pois interage directamente com os lípidos A dos lipopolissacáridos e activa a expressão de citocinas e quimiocinas como IL-6 e IL-8 através de duas cascatas de transdução de sinal que envolvem os factores de transcrição NF- κ B e CREB (1, 4, 20, 21, 22). Ratinhos C3H/HeJ, que possuem uma mutação no gene que codifica para o TLR4, são incapazes de desenvolver uma resposta imunológica na presença de lipopolissacáridos, e desenvolvem infecções graves e crónicas na bexiga, apresentando uma grave dificuldade na eliminação de *Escherichia coli* nos seus rins (1, 4, 20, 21).

As citocinas e as quimiocinas pró-inflamatórias promovem o influxo e a activação de células inflamatórias e a indução de moléculas co-estimuladoras na superfície de células apresentadoras de antígeno. Estas, por sua vez, activam os linfócitos T, iniciando a resposta imune adaptativa (1, 20).

3.5 Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa demora 7-10 dias a desenvolver-se (1). Quer a resposta humoral mediada pelos anticorpos, quer a resposta celular mediada por linfócitos B e T, vão conferir protecção contra ITUs futuras, pois ocorre a mobilização de IgG específicas e linfócitos T activados para a bexiga. Alguns estudos demonstram que a imunidade protectora é mediada por linfócitos T e anticorpos específicos pois observaram que a transferência de células T ou de soro de ratinhos previamente infectados para ratinhos deficientes era suficiente para que estes ficassem protegidos de ITUs por *Escherichia coli*. Esta imunidade também se demonstrou possível por vacinação, através de imunização subcutânea ou intramuscular de ratinhos e primatas com antígenos ou péptidos FimH. No entanto, cerca de 25% de mulheres que sofrem ITUs sem problemas ao nível do sistema imunitário acabam por sofrer ITUs de repetição, o que leva à suspeita de que esta memória imunológica não seja de longa duração, podendo ser necessário recorrer à vacinação (21).

3.6 Estratégias de evasão e Factores de virulência

O microrganismo, por sua vez, tem como objectivos resistir às defesas do hospedeiro e estabelecer uma infecção persistente. Para isso, tem de evitar ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro ou de resistir aos mecanismos de defesa (20).

A virulência define-se como a capacidade que permite que os microrganismos causem doença num determinado hospedeiro. Os factores de virulência são propriedades que conferem vantagem selectiva aos microrganismos, permitindo-lhes superar os mecanismos de defesa do hospedeiro, colonizar os seus epitélios e invadir os seus tecidos, conseguindo assim causar a patologia (5, 16). Estes factores permitem ainda evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro e/ou estimular uma resposta inflamatória por parte deste (5, 15).

Enquanto que, nas ITUs não complicadas, os factores de virulência do hospedeiro são muito importantes para a infecção, nas ITUs complicadas as anomalias do tracto urinário adquirem uma grande importância e os factores de virulência tornam-se menos importantes, interferindo apenas na sintomatologia (9, 16, 19). Verifica-se ainda que uma grande parte das ITUs complicadas são provocadas por microrganismos multi-resistentes, e que ocorrem principalmente em indivíduos internados em hospitais ou lares e/ou que estão sujeitos a antibióterapias frequentes (16). As situações de bacteriúria assintomática podem ser acompanhadas de piúria mas a resposta inflamatória não é suficiente para manifestar sintomas. Isto pode dever-se à actuação das defesas do hospedeiro sobre os microrganismos ou à invasão do tracto urinário por bactérias de virulência reduzida (16).

O mecanismo de virulência mais estudado e melhor conhecido consiste nas adesinas presentes nas fímbrias ou pili bacterianas. O seu papel é mediar a adesão das bactérias a receptores glicoproteicos e glicolipídicos presentes nas células epiteliais do hospedeiro, neste caso, da bexiga (8, 16). A adesão a substratos sólidos é uma propriedade comum a vários microrganismos incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários. Ao aderirem às superfícies do hospedeiro, os microrganismos evitam ser arrastados pelo movimento natural dos fluidos do corpo do hospedeiro (sangue, urina, muco, conteúdo intestinal, entre outros) o que levaria à sua eliminação. No entanto, e como já foi referido, os epitélios do hospedeiro podem sofrer descamação, eliminando os microrganismos independentemente da sua adesão (15).

Existem outros factores de virulência bem conhecidos, incluindo hemolisina, aerobactina, antigénios K ou capsulares, colicina V e urease (8).

4. ETIOLOGIA

A prevalência de agentes uropatogénicos difere entre as ITUs não complicadas e as ITUs complicadas (6).

4.1 ITUs não complicadas

Escherichia coli uropatogénica é o agente etiológico predominante das ITUs, sendo responsável por cerca de 70-95% das ITUs não complicadas adquiridas na comunidade (1, 4, 5, 7, 8, 14, 19, 21). Cerca de 5-10% das ITUs não complicadas são causadas por *Staphylococcus saprophyticus*, e menos de 5% são provocadas por *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus* do grupo B, entre outros (5, 7, 8, 10, 14, 19).

4.2 ITUs complicadas

A etiologia das ITUs complicadas engloba um grupo de microrganismos mais variado do que as ITUs não complicadas, e é frequentemente de natureza polimicrobiana (9, 13, 19). Os agentes etiológicos responsáveis por estas infeções apresentam normalmente maior resistência a antibióticos e menor virulência, e são capazes de afectar hospedeiros com anomalias estruturais, funcionais ou imunológicas, raramente causando doença em hospedeiros saudáveis (9, 19). *Escherichia coli* continua a ser o mais frequente, mas apenas em cerca de 40-50% das ITUs adquiridas em cuidados de saúde, sendo pouco frequente em indivíduos algaliados. Outros microrganismos comuns incluem *Klebsiella pneumoniae* e outras enterobacteriáceas, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolíticos e ainda *Candida* spp. (em indivíduos diabéticos ou a receber antibioterapia de largo espectro) (5, 9).

4.3 Outros grupos de risco

Em crianças, os principais agentes etiológicos de ITUs não complicadas são enterobacteriáceas, enquanto que em ITUs complicadas verifica-se um predomínio de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativos e *Candida* spp. (19).

Os microrganismos mais frequentemente isolados em casos de algaliação de curta duração incluem *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp. e *Candida* spp.. Estas ITUs são normalmente provocadas apenas por uma espécie de microrganismos. Em casos de algaliação de longa duração encontram-se os microrganismos referidos anteriormente mas também outros, como é o caso de *Providencia stuartii*, raramente encontrados no interior do tracto urinário mas que usam o cateter urinário como nicho. Cerca de 95% destas ITUs são de natureza polimicrobiana, podendo coexistir muitas espécies diferentes em concentrações consistentes com ITU (13, 18).

Semelhantemente, os agentes etiológicos mais comuns de ITUs em indivíduos com lesões na espinal medula são *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus mirabilis* (2, 19).

Escherichia coli é o agente etiológico mais prevalente também em indivíduos diabéticos. No entanto, verifica-se um aumento da prevalência de *Klebsiella* spp. e *Enterococcus* spp., em relação a indivíduos não diabéticos (11, 19).

Vários estudos demonstram que os principais agentes etiológicos das ITU em indivíduos seropositivos para HIV incluem *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (2, 12).

5. *ESCHERICHIA COLI*

Como já foi referido, *Escherichia coli* é o agente uropatogénico mais prevalente. Por isso, é interessante conhecer os mecanismos pelos quais é capaz de provocar ITUs, assim como alguns dos seus factores de virulência.

5.1 Patogénese

A adesão às células epiteliais da bexiga é normalmente o passo inicial para o desenvolvimento de uma ITU, pois permite que os microrganismos não sejam eliminados pelo fluxo de urina e outras substâncias que se encontram à superfície da mucosa da bexiga (5, 16, 20).

As estirpes uropatogénicas de *Escherichia coli* expressam a sua superfície estruturas filamentosas com propriedades adesivas que se denominam pili ou fímbrias, e que medeiam a adesão ao epitélio da bexiga. Estas estruturas são principalmente de dois tipos: as fímbrias do tipo 1 e as fímbrias P (1, 4).

Na extremidade das fímbrias do tipo 1 encontram-se as adesinas codificadas pelo gene *fimH*, e estas reconhecem os resíduos de manose das proteínas uroplaquinas presentes na superfície das células epiteliais da bexiga, mediando a adesão a estas (1, 4, 5, 11, 15, 16, 19, 20, 21). A internalização das bactérias nestas células é também mediada pelas fímbrias do tipo 1, permitindo a sua multiplicação e a sua sobrevivência aos mecanismos de defesa do hospedeiro, à acção dos antibióticos e ao fluxo de urina (1, 19, 20, 21).

As adesinas codificadas pelo gene *papG* presentes na extremidade das fímbrias P medeiam a adesão aos dissacáridos de galactose presentes nas células do parênquima renal (1, 4, 15, 16). As estirpes fimbriadas de *Escherichia coli* podem ser distinguidas como manose-resistentes ou manose-sensíveis, consoante apresentam ou não a capacidade de aglutinar eritrócitos na presença de manose (15, 16). As estirpes de *Escherichia coli* que apresentam fímbrias P são classificadas como manose-resistentes e são frequentemente associadas ao desenvolvimento de pielonefrites, uma vez que estas fímbrias apresentam afinidade para receptores que constituem o principal componente glicolípido presente na membrana das células renais (1, 15, 16, 19).

5.2 Estratégias de evasão e Factores de virulência

As estirpes uropatogénicas de *Escherichia coli* isoladas de indivíduos com ITU possuem mais factores de virulência do que estirpes comensais isoladas da flora intestinal, e possuem blocos de genes, denominados por ilhas associadas à patogenecidade (PAI – Pathogenicity Associated Islands), que contribuem para a sua patogenecidade e resistência a antibióticos, pois codificam para vários factores de virulência (desde adesinas e toxinas a mecanismos de resistência às defesas do organismo) (5, 11, 15).

Estas estirpes são capazes de suprimir a actividade do factor NF- κ B (através da estabilização do seu inibidor I κ B) e a apoptose das células epiteliais da bexiga, causando a diminuição da síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, sintetizam moléculas que interferem com as vias de sinalização dos TLR, e inibem a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório e na quimiotaxia, migração e adesão de neutrófilos (4, 20). Estudos *in vitro* demonstram que as estirpes uropatogénicas de *Escherichia coli* são menos susceptíveis à acção dos neutrófilos e induzem mais fracamente a produção de espécies reactivas de oxigénio pelos neutrófilos, quando comparadas com estirpes não uropatogénicas (4).

Como já foi referido, as defesas inatas do hospedeiro conseguem eliminar cerca de 99% dos microrganismos mas, apesar dos seus esforços, cerca de 1% da população infectante (centenas a milhares de microrganismos) é capaz de persistir no epitélio da bexiga (20).

Algumas estirpes de *Escherichia coli* formam agregados, denominados por comunidades bacterianas intracelulares, que têm características de biofilme (1, 4, 5, 21). Apesar do mecanismo de defesa de exfoliação das células epiteliais, estas estirpes intracelulares são capazes de se multiplicar no interior das células e sair antes de o processo de morte celular estar completo. Além disso, a exfoliação da camada superficial de células expõe as camadas mais internas, facilitando o acesso das bactérias a estas (20). Estas comunidades mantêm-se num estado de quiescência na bexiga, e constituem uma possível fonte de bactérias para as ITUs de repetição, adicionalmente às bactérias do tracto gastrointestinal que também têm um papel activo nas infecções recorrentes (1, 4, 20, 21). Verifica-se assim que estas estirpes conseguem iludir as defesas inatas e adaptativas do hospedeiro, e são normalmente resistentes à antibioterapia, o que pode dever-se à baixa concentração de bactérias, à sua localização intracelular e/ou ao seu estado de quiescência (1, 4, 5, 20, 21).

No interior das células, as bactérias multiplicam-se e conseguem atingir concentrações bastante elevadas, o que lhes permite invadir com maior sucesso o tracto urinário e ainda

libertar concentrações significativas de bactérias para o meio ambiente para que possam infectar novos hospedeiros (1, 4, 5, 11, 20).

Para além das adesinas e das fímbrias, são conhecidos outros factores de virulência em estirpes uropatógenicas de *Escherichia coli*. Alguns exemplos são (5, 15, 16):

- Aerobactina – o ferro é utilizado pelos microrganismos para o transporte e armazenamento de O₂, para a síntese de DNA, para o transporte de electrões e para o metabolismo dos peróxidos. A aerobactina é um sideróforo que tem como função quelar o ferro que extrai das proteínas de ligação ao ferro do hospedeiro e entrega directamente nos depósitos de ferro da bactéria, conferindo às estirpes que a produzem vantagem em meios pobres em ferro como a urina;
- Hemolisina – é uma toxina proteica citolítica que lisa eritrócitos e é sintetizada pelos microrganismos para promover a libertação de ferro através da lise dos eritrócitos. Contribui também para a inflamação, causa danos tecidulares e interfere com a quimiotaxia e fagocitose;
- Antigénio O – é uma endotoxina que activa o complemento e estimula a produção de citocinas e quimiocinas promovendo uma resposta inflamatória aguda;
- Antigénio K ou polissacárido capsular – é um polímero de hidratos de carbono que reveste as células, interfere com a detecção do antigénio O e protege a célula dos mecanismos de defesa do hospedeiro pois inibe a fagocitose.

Muitas estirpes de *Escherichia coli* possuem ainda genes que lhes conferem resistência a agentes antimicrobianos. As estirpes que possuem estes genes são principalmente encontradas em hospedeiros debilitados, provavelmente por estes serem sujeitos com grande frequência a agentes antimicrobianos (15).

6. ANTIBIOTERAPIA

O tratamento de ITUs, não complicadas ou complicadas, tem dois objectivos principais: resposta rápida e eficaz à antibioterapia com prevenção da ocorrência de ITUs de repetição, e prevenção do aparecimento de multi-resistências (ou pelo menos prevenir o aumento das resistências já existentes) (6).

Existem vários motivos para que um indivíduo não responda à antibioterapia. Um deles é a escolha inadequada de antibióticos. Por exemplo, o tratamento de uma ITU que afecta a próstata requer antibióticos que penetram na próstata, e o tratamento de pielonefrites requer antibióticos que atingem elevadas concentrações nos rins (5).

A pressão selectiva exercida pelos antibióticos em vários ambientes, incluindo lares e hospitais, contribui para a selecção e propagação de clones resistentes (5). A resistência aos antibióticos complica o tratamento das ITUs e está associada a maior morbilidade, aumento dos custos de re-avaliação e re-tratamento, maiores taxas de hospitalização e aumento do uso de antibióticos de largo espectro (5, 7). Os perfis de susceptibilidade dos microrganismos mais frequentes em cada comunidade devem ser conhecidos para que seja possível tomar decisões empíricas correctamente, evitando contribuir para o aumento das resistências (8).

Assim, na escolha da antibioterapia deve considerar-se a localização geográfica, o agente uropatogénico, a susceptibilidade *in vitro*, a relação custo-eficácia, os possíveis efeitos secundários assim como a idade, a raça e os sintomas do hospedeiro (7, 19).

6.1 Resistências

É importante conhecer os mecanismos, intrínsecos e adquiridos, que proporcionam aos microrganismos a resistência aos antibióticos, para otimizar estratégias de tratamento para as ITUs (5).

A resistência intrínseca constitui uma insensibilidade a determinados antibióticos, inerente ao próprio microrganismo. A resistência adquirida deve-se a alterações genéticas no genoma dos microrganismos provocadas por mutações em determinados genes, ou pela aquisição de genes de resistência através de transferência horizontal (plasmídeos, integrões, bacteriófagos, entre outros). Representa uma ameaça significativa para a saúde humana (5).

Vários estudos indicam que os agentes uropatogénicos estão a tornar-se cada vez mais resistentes às antibioterapias apropriadas para ITUs. Por exemplo, estão a aumentar as ITUs

provocadas por estirpes ESBL, estirpes produtoras de β -lactamases de largo espectro. Outro exemplo são as resistências a antibióticos de largo espectro como as fluoroquinolonas (5).

Estratégias para a prevenção do aumento das resistências incluem a diminuição do consumo de antibióticos, a rotação de antibióticos, novas estratégias de dose e a escolha de combinações de antibióticos (6).

6.2 ITUs não complicadas

A primeira medida a tomar em caso de ITU é beber muita água e repousar (8). Alguns autores referem uma aproximação profiláctica para casos de mulheres jovens com ITUs de repetição associadas às relações sexuais, sugerindo a acidificação da urina, sumo de arando vermelho, extracto de folhas secas de uva ursi e aplicação vaginal de *Lactobacillus* (8, 14). Outros autores referem a toma de uma dose apenas antes ou após as relações sexuais (5, 8, 14). Em mulheres pós-menopausa com ITUs de repetição deve ser prescrita antibioterapia mas também deve ser aconselhada uma terapêutica de substituição de estrogénios (8).

De qualquer das formas, na maioria dos casos é necessário recorrer a agentes antimicrobianos (8).

As características ideais de um agente antimicrobiano usado no tratamento de ITUs incluem ser activo contra os agentes uropatogénicos mais frequentes, ser excretado na forma activa por filtração glomerular para a urina, apresentar concentração e níveis inibitórios adequados na urina e nos tecidos, e ser activo nos valores de pH da urina (5). Pretende-se que atinja maior concentração no tracto urinário do que noutros tecidos, nomeadamente na vagina e nos intestinos (8).

O objectivo no tratamento de uma ITU não complicada é eliminar os sintomas e os microrganismos (5).

Os agentes antimicrobianos mais frequentemente utilizados no tratamento de ITUs não complicadas são os β -lactâmicos, a associação trimetoprim/sulfametoxazol, as fluoroquinolonas, a nitrofurantoína e a fosfomicina (5, 14).

Os antibióticos de três doses são geralmente mais eficazes do que os de uma dose apenas e de eficácia semelhante aos de sete doses, com as vantagens de não provocarem tantos efeitos secundários e de a adesão por parte do paciente ser melhor (3, 8, 14).

As doses recomendadas para o tratamento de ITUs não complicadas são três doses de cotrimoxazol, três doses de fluoroquinolonas, sete doses de nitrofurantoína e uma dose de fosfomicina (7, 19).

6.2.1 β -Lactâmicos

Os β -lactâmicos são agentes bactericidas que inibem a síntese da parede celular (5, 8).

No grupo das aminopenicilinas, a ampicilina e a amoxicilina têm sido extensivamente utilizadas no tratamento de cistites, o que tem provocado o aumento de resistências pela produção de β -lactamases, ou seja, enzimas que inactivam estes antibióticos (5, 8).

Uma opção contra *Escherichia coli* é a associação amoxicilina/ácido clavulânico, pois o ácido clavulânico inibe a acção das β -lactamases (apesar de a sua acção depender na concentração de β -lactamases sintetizadas), permitindo a actuação da amoxicilina. No entanto, esta associação é mais cara e tem mais efeitos secundários, pois altera bastante a flora vaginal, aumentando o risco de ITUs de repetição e de vaginites fúngicas (5, 8). Além disso, o uso da associação trimetoprim/sulfametoxazol e de fluoroquinolonas é mais eficaz no tratamento de cistites não complicadas (5, 7).

No grupo das cefalosporinas consideram-se várias classes, sendo que a sua actividade contra *Escherichia coli* aumenta desde a primeira até à quarta gerações. No entanto, as classes mais recentes são mais caras e oferecem menos alternativas orais. Da mesma forma que no grupo anterior, a resistência às cefalosporinas tem aumentado. A resistência das enterobacteriáceas às cefalosporinas de terceira geração deve-se também à acção de β -lactamases. As cefalosporinas são uma boa opção para o tratamento de ITUs não complicadas em grávidas (5).

6.2.2 Trimetoprim/Sulfametoxazol

A associação trimetoprim/sulfametoxazol ou cotrimoxazol tem efeito bactericida pois inibe a síntese de ácido tetraidrofólico, necessário para a síntese de DNA. Como as bactérias não conseguem obter ácido fólico do meio que as envolve, dependem da sua síntese de novo, e desta forma a inibição da síntese do ácido fólico inibe a replicação do DNA (5).

O cotrimoxazol tem um efeito moderado nas floras vaginal e intestinal (8). É recomendado como primeira linha de tratamento de cistites, mas as resistências têm vindo a aumentar bastante, considerando-se as quinolonas como opção (3, 5, 7, 8, 19).

6.2.3 Quinolonas

As quinolonas são agentes bactericidas que interferem com a síntese de DNA e RNA. As fluoroquinolonas inibem a DNA girase e por isso interferem com a replicação, reparação e transcrição do DNA, levando à morte celular. Nas bactérias Gram-negativas o alvo é a DNA girase, enquanto que nas bactérias Gram-positivas o alvo é a topoisomerase IV (5, 8, 14).

As fluoroquinolonas têm um largo espectro de actividade e atingem concentrações óptimas nos tecidos e, por isso, são utilizadas no tratamento de ITUs complicadas e não complicadas. No entanto, são contra-indicadas em grávidas, crianças e adolescentes, por interferirem com a formação das cartilagens, em atletas de alta competição, por estes poderem sofrer tendinite e ruptura do tendão de Aquiles, e em indivíduos com alterações do ritmo cardíaco (5, 8, 14). Apesar de não serem agentes nefrotóxicos, a dose de fluoroquinolonas deve ser ajustada em indivíduos com falência renal (5).

As fluoroquinolonas mais utilizadas são a ciprofloxacina, a levofloxacina e a norfloxacina, sendo a ciprofloxacina uma boa opção para indivíduos alérgicos a outros agentes, idosos, diabéticos e indivíduos com ITUs de repetição. As fluoroquinolonas são frequentemente consideradas como a primeira escolha para o tratamento de ITUs devido ao aumento da resistência de *Escherichia coli* ao cotrimoxazol (5). No entanto, a resistência de *Escherichia coli* às fluoroquinolonas tem também vindo a aumentar, e geralmente é determinada por mutações cromossomais mas pode também ser mediada por plasmídeos (3, 5). Assim, é desaconselhado o uso de fluoroquinolonas para o tratamento de ITUs por rotina, como forma de controlo do aumento das resistências, podendo ser substituída pela nitrofurantoína (5, 7, 8, 19).

6.2.4 Nitrofurantoína

A nitrofurantoína é um agente bactericida que inibe a acetilcoenzima A bacteriana, interferindo com a formação da parede celular. A molécula de nitrofurantoína é reduzida pelas flavoproteínas bacterianas em intermediários reactivos que inactivam ou alteram as proteínas ribossomais bacterianas e outras macromoléculas, e inibe assim o metabolismo aeróbico e, consequentemente, a síntese de DNA, RNA, parede celular e proteínas (5).

É unicamente indicada para cistites não complicadas (5, 7, 8). É absorvida no tracto gastrointestinal e excretada pelos rins, e não é detectada nas fezes, o que significa que não afecta a flora gastrointestinal. É muito eficaz contra *Escherichia coli* em ITUs não

complicadas mas alguns agentes uropatogénicos como *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. são intrinsicamente resistentes (5, 8). Naturalmente deve ser considerada como alternativa às fluoroquinolonas em casos em que se verifica resistência ao cotrimoxazol, para prevenir o aumento da resistência às fluoroquinolonas (5, 7).

6.2.5 Fosfomicina

A fosfomicina é um análogo da fosfoenolpiruvato que inibe a enolpiruvato transferase, impedindo a formação de ácido N-acetilmurâmico, um componente essencial da camada de peptidoglicano (5).

A fosfomicina penetra nas células através de um sistema de permeases e qualquer mutação nestas permeases pode impedir a sua entrada. A resistência à fosfomicina é cromossomal ou transmitida por plasmídeos. A resistência cromossomal consiste na produção da fosfomicina-glutatio-S-transferase, uma enzima constitutiva que inactiva este antibiótico no periplasma. A resistência mediada por plasmídeos leva a modificações enzimáticas do antibiótico (5).

A fosfomicina é moderadamente activa contra *Escherichia coli* e vários outros microrganismos responsáveis por ITUs não complicadas. Constitui uma das antibióterapias mais caras (5, 7).

6.3 ITUs complicadas

Nas ITUs complicadas, é maior a probabilidade de os agentes etiológicos apresentarem mais resistências do que os microrganismos responsáveis por ITUs não complicadas (9).

Os objectivos no tratamento de ITUs complicadas incluem eliminar os sintomas e os microrganismos, identificar a anomalia subjacente ao desenvolvimento de ITUs e, se possível, corrigi-la. Se a anomalia não pode ser corrigida, como ocorre em casos de bexiga neurogénica com algaliação intermitente, o tratamento passa a visar a melhoria dos sintomas de episódios agudos e a prevenção de complicações resultantes da infecção assim como prevenir o aparecimento de microrganismos resistentes em infecções subsequentes. O objectivo do tratamento pode ainda ser profilático, para prevenir a infecção, ou supressivo, para prevenir infecções sintomáticas e preservar a função renal quando a infecção não pode ser curada (9).

A selecção da antibióterapia para ITUs complicadas sintomáticas depende do perfil de susceptibilidade do microrganismo infectante, da sintomatologia, da tolerância do indivíduo,

da eficácia documentada do antibiótico no tratamento de ITUs assim como de factores administrativos como o custo e as formulações disponíveis (9). Se a sintomatologia não for grave, é preferível esperar pelos resultados laboratoriais (identificação de microrganismos e perfil de susceptibilidade aos antibióticos) antes de implementar a antibioterapia. Caso tenha sido implementada antibioterapia empírica, é conveniente re-avaliar a escolha dos antibióticos de acordo com os resultados laboratoriais obtidos (9, 13).

Em pacientes com sintomas moderados podem ser utilizados antibióticos orais como cotrimoxazol, nitrofurantoína e fluoroquinolonas, como antibioterapia empírica inicial. A nitrofurantoína deve ser evitada em indivíduos com falência renal, e é particularmente eficaz no tratamento de infecções provocadas por *Enterococcus* resistente à vancomicina (9, 13).

Em pacientes com sintomas mais graves como febre, sépsis ou vômitos, e em infecções provocadas por microrganismos resistentes à antibioterapia oral, deve ser utilizada antibioterapia parentérica. Aminoglicosídeos como a gentamicina, com ou sem ampicilina, têm sido a principal escolha de antibioterapia parentérica em indivíduos com função renal normal. Podem também ser eficazes outros agentes incluindo quinolonas, combinações de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases, e cefalosporinas de largo espectro. Assim que o indivíduo estabilize, a antibioterapia parentérica pode ser substituída por antibioterapia oral (9, 13).

A duração da antibioterapia para o tratamento de ITUs complicadas é ainda pouco clara. Em indivíduos com sintomas de cistite é aconselhada uma antibioterapia de sete dias, enquanto que em indivíduos com sintomas sistémicos mais graves, é aconselhada uma antibioterapia de 10-14 dias (9, 13). As antibioterapias de três dias, eficazes no tratamento de ITUs não complicadas, são desaconselhadas em ITUs complicadas. Tratamentos mais longos de 4-6 semanas são aconselhados em ITUs de repetição, quando a antibioterapia de 10-14 dias não é suficiente. Em homens com ITUs de repetição de origem prostática, é recomendada antibioterapia de 6-12 semanas (9).

Indivíduos com anomalias persistentes do tracto urinário podem apresentar uma elevada frequência de ITUs de repetição (incluindo ITUs recorrentes e recidivas) após a antibioterapia e, independentemente dos agentes antimicrobianos utilizados, a taxa de re-infecção após 4-6 semanas é de 40-60%. O tipo de anomalia do tracto urinário subjacente pode determinar a probabilidade de ITUs recorrentes ou de recidivas. Indivíduos com falência renal ou algaliados com formação de biofilmes nos cateteres urinários apresentam um maior risco de

recidivas enquanto que os indivíduos com bexiga neurogénica apresentam uma maior risco de ITUs recorrentes. As ITUs de repetição são muitas vezes assintomáticas e, geralmente, não requerem nova antibioterapia, salvo algumas excepções (9).

Em pacientes algaliados com bacteriúria sintomática, deve ser identificado o agente etiológico para que seja instituída a terapêutica apropriada (3, 8). A duração recomendada da antibioterapia de ITUs sintomáticas associadas a cateteres urinários é de sete dias, se a resposta for satisfatória. O período de antibioterapia deve ser o mais curto possível se o cateter urinário não puder ser removido, pois o risco de infecção permanece elevada quando o cateter urinário não é removido e há maior probabilidade de se desenvolver uma super-infecção se o indivíduo estiver a receber antibioterapia. A profilaxia é desaconselhada pois não diminui a morbilidade e, pelo contrário, aumenta a probabilidade de infecções por microrganismos resistentes (9).

A bacteriúria assintomática, frequente em indivíduos com ITUs complicadas, só requer tratamento em algumas situações (3, 9). Quando um indivíduo necessita de cirurgia invasiva no tracto genitourinário, a infecção deve ser eliminada previamente para diminuir o risco de bacterémia e choque séptico associado à cirurgia (9). Outras situações incluem mulheres grávidas, indivíduos com neutropénias profundas, transplantados renais e indivíduos com infecções por *Proteus* spp. (2, 8, 9). A bacteriúria assintomática é ainda frequente nos indivíduos com lesões na espinal medula mas, da mesma forma, só requer tratamento em situações específicas como imunossupressão, refluxo vesicouretral ou colonização do tracto urinário com bactérias produtoras de urease (13, 17). A terapêutica deve ser evitada noutros casos, uma vez que pode, inclusivé, aumentar a frequência das infecções sintomáticas em alguns grupos (9).

As ITUs sofridas por indivíduos diabéticos, apesar de poderem ser caracterizadas por maiores complicações, geralmente não requerem uma terapêutica diferente ou de maior duração (9).

Indivíduos com falência renal perdem a capacidade de filtração glomerular e secreção tubular, e desta forma não conseguem concentrar o antibiótico na urina, dificultando o tratamento de ITUs. Os aminoglicosídeos não são eficazes, a nitrofurantoína deve ser evitada porque atinge concentrações tóxicas no soro, e a antibioterapia aconselhada é cefalosporinas de largo espectro e quinolonas (9, 13). Em casos em que a falência renal é unilateral, a

concentração de antibiótico pode não atingir as concentrações necessárias no rim afectado, ocorrendo ITUs de repetição após terminar a terapêutica. Devem ser então aplicadas antibioterapias mais longas, de 6 -12 semanas de duração, ou antibioterapia supressiva (9).

6.4 Vacinas e Probióticos

Para além dos antibióticos disponíveis para o tratamento das ITUs, existem também agentes sob a forma de vacinas, recomendados para a imunização dos indivíduos com tendência para sofrer ITUs de repetição (não complicadas) (6).

Uro-vaxom é um extracto bacteriano administrado por via oral, que consiste em componentes imunoestimulantes derivados de 18 estirpes de *Escherichia coli* uropatogénica. Vários estudos testaram a sua eficácia, e comprovaram a eficácia deste composto na prevenção de ITUs de repetição (6, 14).

Strovac é um extracto de células bacterianas de estirpes de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. É administrado intramuscularmente também para a prevenção de ITUs de repetição (6).

Por fim, é ainda útil o uso de probióticos. Estes consistem em microrganismos que fortalecem a flora natural do tracto urinário (neste caso), reduzindo a prevalência de microrganismos uropatogénicos (6, 17). Alguns estudos demonstraram que a administração vaginal de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus reuteri* reduz a incidência de ITUs de repetição e que a administração oral dos mesmos microrganismos reduz significativamente a colonização vaginal por agentes uropatogénicos (bacterianos e fúngicos). No entanto, poucos estudos obtiveram resultados positivos no tratamento de ITUs através da administração de probióticos (6).

6.5 Novas abordagens

O uso generalizado de antibioterapia de largo espectro tem vindo a provocar o aparecimento de microrganismos multi-resistentes, o que requer uma maior reflexão e procura de novas abordagens para os combater (21).

Algumas estratégias incluem melhorar substâncias conhecidas para que adquiram maior biodisponibilidade e vida-média mais longa, avaliar o efeito de substâncias conhecidas em patologias diferentes, criar novos derivados de classes conhecidas para aumentar o espectro de actuação, criar novas classes com alvos diferentes, aplicar substâncias que aumentem a susceptibilidade dos microrganismos (como inibidores de bombas de efluxo), prevenir o aumento das resistências, entre outros (6).

Uma opção consiste em modular os mecanismos de defesa inata e adaptativa do hospedeiro, podendo resultar em importantes alternativas de terapêutica e de profilaxia para as ITUs (21).

Tendo em conta a importância que o TLR4 demonstra na defesa do tracto urinário, a administração de ligandos específicos deste receptor directamente no tracto urinário poderia despoletar as respostas inatas mediadas por ele e, consequentemente, a reactividade e resistência à ITU. Estas respostas incluem a activação da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, assim como o bloqueio da invasão das células epiteliais da bexiga e a eliminação de células infectadas. Uma metodologia semelhante foi já demonstrada no tracto genital, onde foram administrados ligandos dos receptores TLR3 e TLR9 na vagina de ratinhos, tendo resultado na protecção contra infecções pelo vírus Herpes Simplex-2, através da estimulação da produção de substâncias pró-inflamatórias e da mobilização de células inflamatórias. No entanto, esta experiência demonstrou uma desvantagem, pois o tratamento com ligandos dos TLR só foi eficaz quando aplicado antes ou durante o início da infecção, e não em infecções já instaladas. Esta metodologia não foi ainda demonstrada no tracto urinário, mas estudos que provocaram o aumento artificial dos níveis de AMP cíclico nas células epiteliais da bexiga de ratinhos mutantes conseguiram restaurar a resistência destes ratinhos à invasão por estirpes de *Escherichia coli*. Uma conclusão importante a retirar destes estudos é que poderá não ser necessário utilizar ligandos do receptor TLR4, uma vez que é possível estimular a via de transdução de sinal em passos mais a jusante (21).

Uma vez que a actuação dos linfócitos B e T está dependente do estímulo das defesas inatas, a modulação das defesas inatas poderá também resultar na estimulação das respostas

adaptativas. Inclusivamente, são já utilizados moduladores da resposta inata como adjuvantes em vacinas para estimular a imunidade (21).

Um dos objectivos da administração de vacinas directamente no tracto urinário é estimular a produção de IgA secretórias na sua superfície, pois a imunização subcutânea, intramuscular ou intravenosa conduz à síntese de IgG e não de IgA. No entanto, administrar vacinas directamente do tracto urinário não é fácil. Alguns autores experimentaram a imunização de ratinhos com antigénios de *Proteus mirabilis* ao nível da mucosa nasal, e verificaram que ocorreu o aumento dos níveis de IgA secretória na urina, acompanhada de notável resistência ao desenvolvimento de ITU por *Proteus mirabilis*. A imunização ao nível da mucosa nasal é bastante eficaz na estimulação da síntese de IgG e IgA, provavelmente por ocorrer a activação do tecido linfóide associado à mucosa nasal (NALT – Nasal Associated Lymphoid Tissue) que constitui um indutor imunológico potente, podendo levar à ampliação da resposta imune (21).

O uso de moduladores das defesas inatas e adaptativas tem de ser adaptado a cada caso de ITU, considerando o perfil de susceptibilidade a antibióticos e os factores de virulência de cada microrganismo, assim como a idade e anomalias estruturais, funcionais ou imunológicas dos hospedeiros. Considerando o primeiro exemplo dado, o uso de ligandos do TLR4 em indivíduos com deficiências genéticas ao nível destes receptores não irá conferir protecção, enquanto que o uso de activadores da via de transdução de sinal em passos a jusante poderá conferir essa protecção (21).

Outra opção consiste no uso de enzimas líticas de bacteriófagos, capazes de digerir a parede celular das bactérias para a libertação dos fagos recém-formados. Estas enzimas têm sido usadas com sucesso em estudos animais no tratamento de infecções sanguíneas e das mucosas. Os fagos apresentam elevada especificidade para os microrganismos sem afectar negativamente a flora natural do hospedeiro. Esta estratégia pode ter sucesso pois baseia-se em mecanismos altamente conservados e eficazes (6).

No que diz respeito a ITUs complicadas, devem também ser procuradas opções não terapêuticas para diminuir a sua incidência. São exemplos o uso de cateteres urinários de material resistente à infecção ou à formação de biofilmes, a colonização do tracto urinário com organismos que interfiram com o desenvolvimento de infecções por microrganismos mais virulentos, e a criação de vacinas contra determinados microrganismos ou factores de virulência (9).

7. INFECÇÕES FÚNGICAS

Tem sido observado um aumento da frequência de ITUs de origem fúngica (9). O principal agente etiológico é *Candida albicans*, seguido de outras espécies do mesmo género, incluindo *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Estas infecções geralmente ocorrem em indivíduos que receberam antibioterapia de largo espectro e que se encontram algaliados, sendo a diabetes *mellitus* também um factor de risco (3, 9).

A infecção é normalmente assintomática, mas pode também ser sintomática e, por vezes, ocorrem complicações pela formação de uma massa de hifas, denominada por bola fúngica, que pode conduzir à obstrução do fluxo urinário (9).

Não é aconselhado o tratamento de infecções assintomáticas, pois não parece ter um efeito marcado. Para as infecções sintomáticas existem várias opções. O fluconazol atinge concentrações significativas na urina, sendo indicado para o tratamento de ITUs e recomendado para o tratamento de infecções por *Candida albicans* (formulação oral ou parentérica). Outras espécies, como *Candida tropicalis*, são frequentemente resistentes ao fluconazol, sendo recomendado o uso de anfotericina B (9, 18).

8. PROJECTO ECO•SENS

O projecto ECO•SENS consiste na primeira pesquisa sobre a prevalência e a susceptibilidade de microrganismos uropatogénicos responsáveis por ITUs não complicadas adquiridas na comunidade, em mulheres de 18-65 anos, em 252 centros de cuidados comunitários de 16 países da Europa e do Canadá (23).

Este estudo demonstrou, em 2003, que *Escherichia coli* é o agente uropatogénico mais comum, excedendo 70% das infecções (excepto em Portugal e na Grécia). *Proteus mirabilis* é o segundo agente uropatogénico mais comum e, juntamente com *Klebsiella* spp., apareceu em mais casos no sul da Europa. *Staphylococcus saprophyticus* apareceu em vários casos na Suécia e demonstra sazonalidade nos países nórdicos (23).

Os perfis de susceptibilidade de *Escherichia coli* responsáveis por 86 ITUs em Portugal demonstram resistências de 45.3% à ampicilina, 9.3% à amoxicilina/ácido clavulânico, 26.7% ao cotrimoxazol, 5.8% à ciprofloxacina, 5.8% à nitrofurantoína e 0.0% à fosfomicina, contra 29.8%, 3.4%, 14.1%, 2.3%, 1.2% e 0.7%, respectivamente, no total dos países (2478 casos) (Figura 8.A) (23).

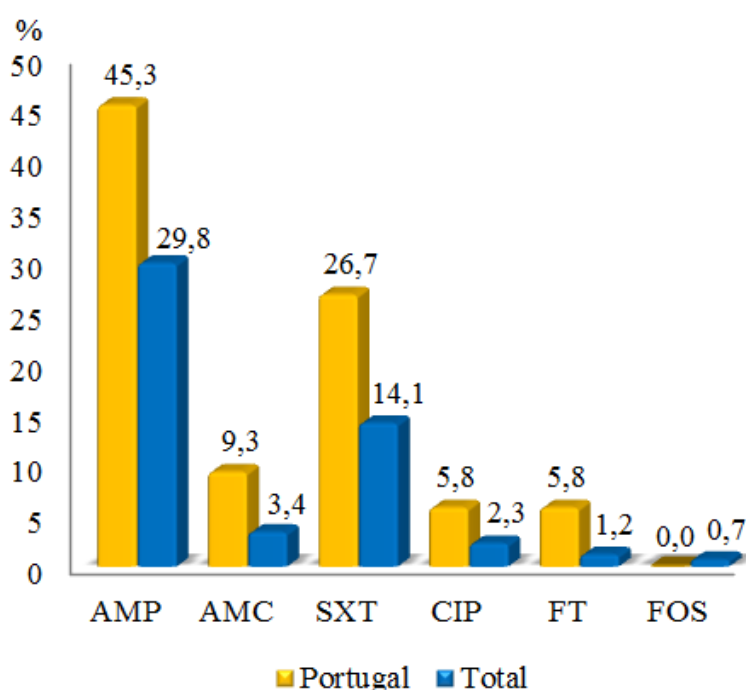


Figura 8.A – Comparação da resistência das estirpes de *Escherichia coli* aos antibióticos, em Portugal e no grupo de países considerados.

AMP – ampicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; SXT – trimetoprim/sulfametoxazol;
CIP – ciprofloxacina; FT – nitrofurantoína; FOS – fosfomicina.

No geral, *Proteus mirabilis* é menos resistente à ampicilina e mais resistente ao cotrimoxazol e à fosfomicina do que *Escherichia coli* enquanto que *Klebsiella* spp. é mais resistente à fosfomicina e menos resistente ao cotrimoxazol e à ciprofloxacina. *Proteus mirabilis* e *Klebsiella* spp. são intrinsecamente resistentes à nitrofurantoína. *Staphylococcus saprophyticus* é intrinsecamente resistente à fosfomicina, mas não foram detectadas mais resistências, uma vez que é um microrganismo sazonal e as estirpes estudadas são provavelmente estirpes novas não expostas a pressões antimicrobianas (23).

Este estudo conclui que é necessário reconsiderar o uso empírico da ampicilina, do cotrimoxazol e das quinolonas em Portugal assim como noutros países, como Espanha (23).

9. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA – FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA

9.1 Susceptibilidade aos antibióticos em 2008 e 2010

Em 2010 foi realizada a análise dos perfis de susceptibilidade de estirpes uropatogénicas responsáveis por cistites não complicadas na comunidade, aos antibióticos tipicamente usados no tratamento de ITUs. Os resultados foram comparados com os perfis obtidos em 2008 num estudo realizado por Silva et al. que contemplou 446 estirpes uropatogénicas também responsáveis por cistites não complicadas na comunidade (24, 25).

Este estudo contemplou 577 estirpes obtidas por isolamento em urinas de mulheres com ITUs não complicadas, em 10 Laboratórios de Análises Clínicas de prestação de serviços à comunidade. Os antibióticos testados incluíram a amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefuroxima, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, nitrofurantoína e fosfomicina. As estirpes foram isoladas e identificadas nos laboratórios de origem, e o estudo de susceptibilidade aos antibióticos foi efectuado neste laboratório, através da técnica de difusão em agar, tendo os resultados sido interpretados de acordo com as normas do CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (25, 29).

No conjunto de estirpes estudadas, *Escherichia coli* foi o agente uropatogénico mais frequente (75.9%, n=438), seguido de *Klebsiella* spp. (8.7%, n=50) e *Proteus* spp. (4.2%, n=24) (25) (Figura 9.A).

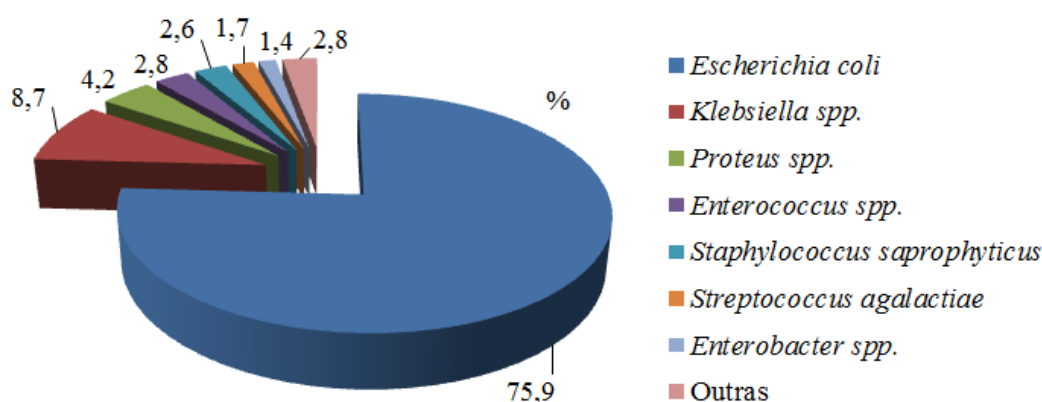


Figura 9.A – Estirpes uropatogénicas isoladas em 577 urinas de mulheres con cistites não complicadas (2010).

Relativamente ao estudo de 2008, verificou-se que *Escherichia coli* manteve-se a estirpe predominante, enquanto que *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. sofreram uma inversão. As restantes estirpes mantiveram a sua prevalência (25) (Tabela 9.A).

Tabela 9.A – Distribuição das espécies predominantes em 2008 e 2010.

Espécies	2008 (n=446)		2010 (n=577)	
<i>Escherichia coli</i>	327	(73.3%)	438	(75.9%)
<i>Klebsiella</i> spp.	23	(5.2%)	50	(8.7%)
<i>Proteus</i> spp.	37	(8.3%)	24	(4.2%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12	(2.7%)	15	(2.6%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	9	(2.0%)	10	(1.7%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	(1.4%)	8	(1.3%)

Outra diferença verificou-se nas faixas etárias, uma vez que o pico de cistites não complicadas ocorreu no intervalo 71-80 anos em 2010, enquanto que em 2008 o pico ocorreu no intervalo 21-30 anos (25) (Figura 9.B).

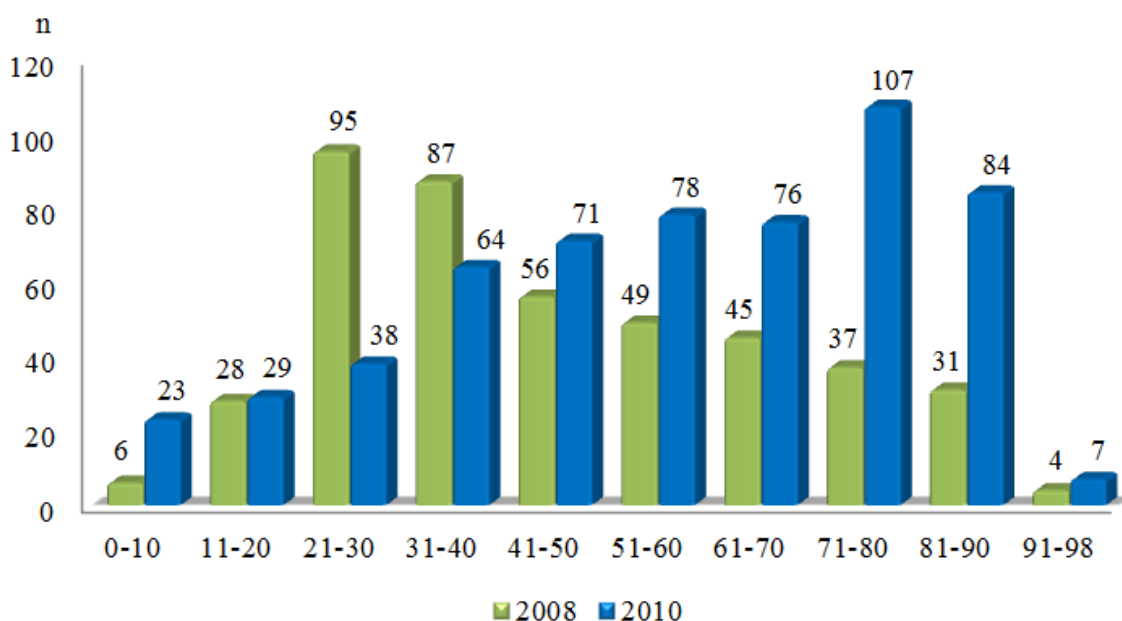


Figura 9.B – Distribuição das estirpes uropatogénicas identificadas em 2008 e 2010, de acordo com o grupo etário, provenientes de urinas de mulheres com cistites não complicadas.

No conjunto de antibióticos estudados, verificou-se que as resistências mais acentuadas no conjunto de estirpes ocorreram em relação à amoxicilina (49.1%, n=283), cotrimoxazol (25.6%, n=148) e ciprofloxacina (15.2%, n=88) (25) (Figura 9.C).

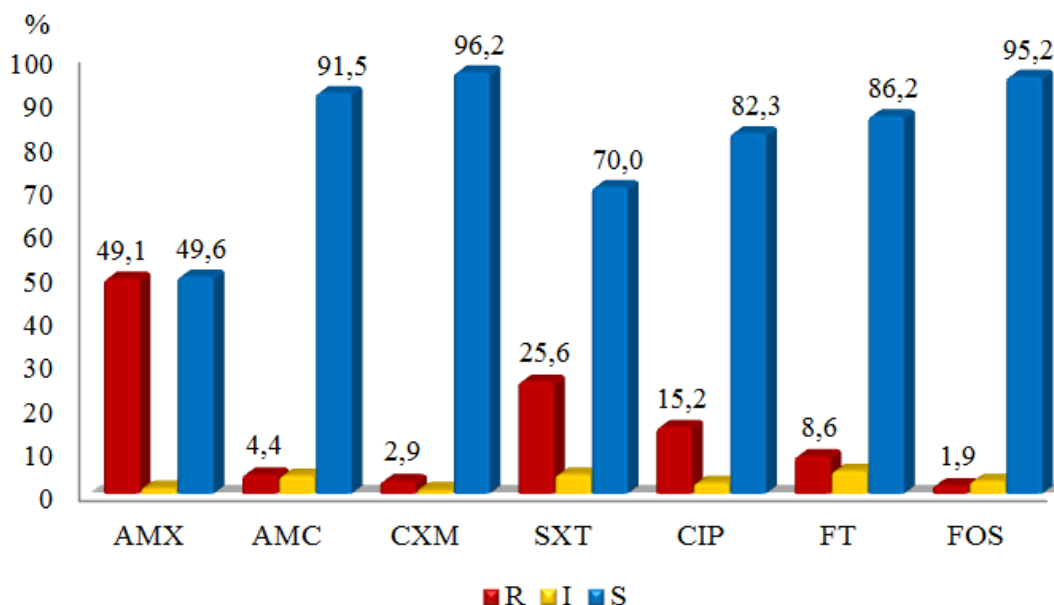


Figura 9.C – Susceptibilidade de 577 estirpes uropatogénicas aos antibióticos testados.
 AMX – amoxicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; CXM – cefuroxima;
 SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; CIP – ciprofloxacina; FT – nitrofurantoína; FOS – fosfomicina.
 R – resistente; I – intermédio; S – sensível.

Nas 438 estirpes de *Escherichia coli*, verificou-se que as resistências mais acentuadas ocorreram em relação aos mesmos antibióticos: amoxicilina (44.8%, n=196), cotrimoxazol (26.1%, n=114) e ciprofloxacina (16.1%, n=71) (25) (Figura 9.D).

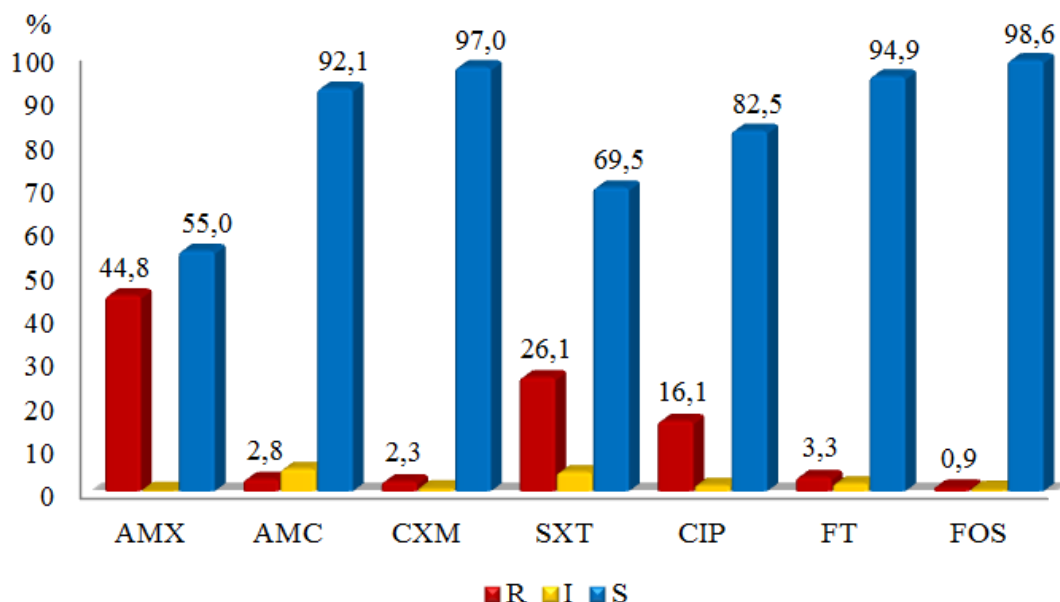


Figura 9.D – Susceptibilidade de 438 estirpes de *Escherichia coli* aos antibióticos testados.
 AMX – amoxicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; CXM – cefuroxima;
 SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; CIP – ciprofloxacina; FT – nitrofurantoína; FOS – fosfomicina.
 R – resistente; I – intermédio; S – sensível.

Relativamente a 2008, *Escherichia coli* manifestou um aumento de resistência a todos os antibióticos, com a excepção da cefuroxima (de 4.5% para 2.3%). O aumento mais marcado verificou-se para a ciprofloxacina (de 8.2% para 16.1%), enquanto que o menos marcado ocorreu para a fosfomicina (de 0.5% para 0.9%, inferior a 1%) (25) (Figura 9.E).

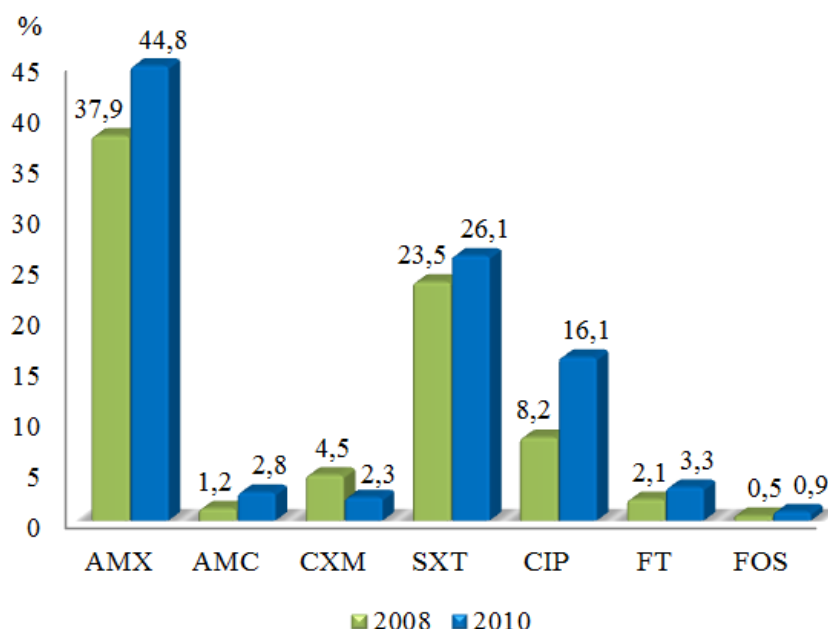


Figura 9.E – Estirpes de *Escherichia coli* resistentes aos antibióticos, isoladas em 2008 e 2010.
 AMX – amoxicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; CXM – cefuroxima;
 SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; CIP – ciprofloxacina; FT – nitrofurantoína; FOS – fosfomicina.

Este estudo permite concluir que *Escherichia coli* continua a ser o agente uropatogénico mais frequente (seguido de *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp.) e que as resistências mais acentuadas verificam-se em relação à amoxicilina, ao cotrimoxazol e à ciprofloxacina, sendo que as estirpes encontradas em 2010 evidenciam mais resistências do que em 2008 (25).

9.2 Bactérias uropatogénicas na comunidade em 2010

Foi realizado o estudo da etiologia das ITUs (complicadas e não complicadas) na comunidade em Portugal e da susceptibilidade dos agentes uropatogénicos aos antibióticos tipicamente utilizados no tratamento destas infecções. Neste estudo foi ainda analisada a relação entre os factores de risco do hospedeiro e os factores de virulência de *Escherichia coli* que lhe permitem ser o agente etiológico mais frequente destas infecções (26).

O estudo contemplou 1020 estirpes uropatogénicas obtidas por isolamento em urinas de indivíduos com ITUs (não complicadas e complicadas), em 10 Laboratórios de Análises Clínicas de prestação de serviços à comunidade. Os antibióticos testados incluíram a amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefuroxima, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, nitrofurantoína e fosfomicina. As estirpes foram isoladas e identificadas nos laboratórios de origem, e o estudo de susceptibilidade aos antibióticos foi efectuado neste laboratório, através da técnica de difusão em agar, tendo os resultados sido interpretados de acordo com as normas do CLSI (26, 29).

Foram reunidos dados sobre os indivíduos, incluindo idade, sexo e factores de risco (algaliação, imobilidade (indivíduos acamados), gravidez, diabetes *mellitus* e história de ITUs prévias). Foi efectuada a pesquisa de genes de virulência que codificam para adesinas fimbriais em 170 estirpes de *Escherichia coli*, através da técnica de PCR, usando primers e programas específicos, e posterior confirmação por sequenciação (26).

Escherichia coli é o agente uropatogénico predominante (69.7%, n=711), seguido de *Klebsiella spp.* (9.0%, n=92) e *Proteus spp.* (7.0%, n=71) (26) (Figura 9.F).

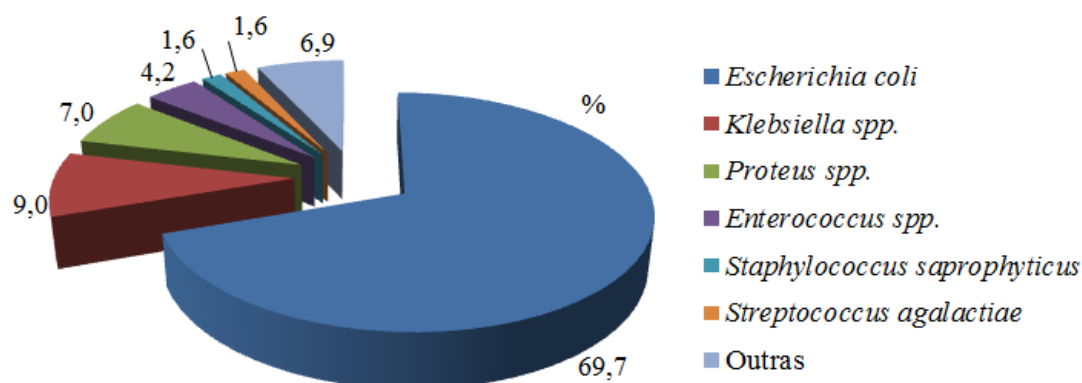


Figura 9.F – Estirpes uropatogénicas isoladas em 1020 urinas.

O estudo de susceptibilidade aos antibióticos foi efectuado apenas para as estirpes Gram-negativas, visto representarem 91.2% (n=930) do total. No conjunto de antibióticos estudados, verifica-se que as resistências mais acentuadas ocorreram em relação à amoxicilina (48.9%, n=455), cotrimoxazol (28.4%, n=264) e ciprofloxacina (18.2%, n=169). O antibiótico menos associado a resistência é a fosfomicina (3.9%, n=36) (26) (Figura 9.G).

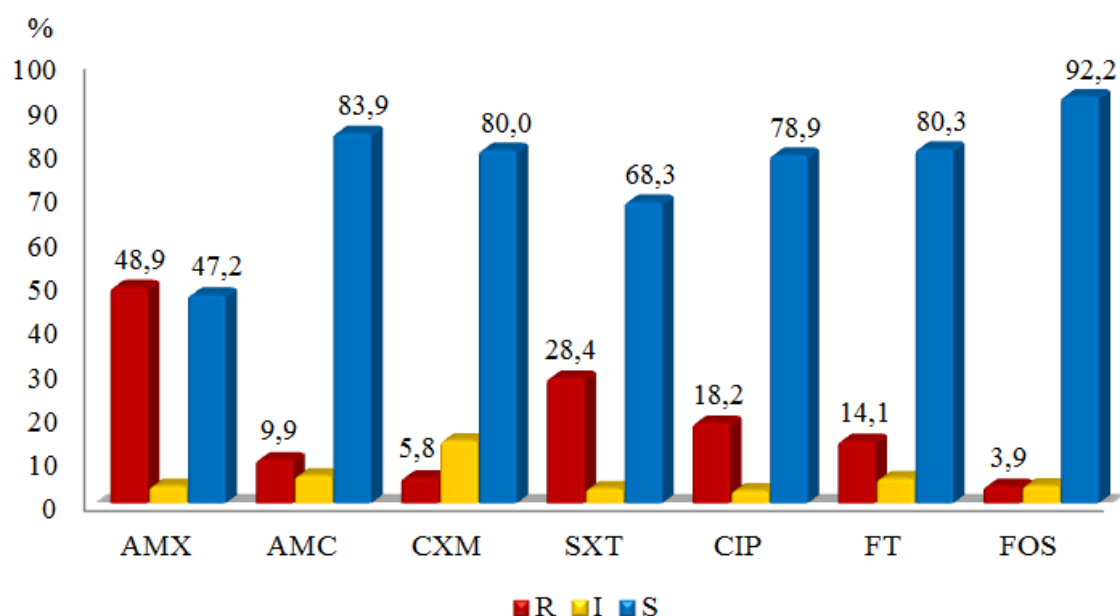


Figura 9.G – Susceptibilidade aos antibióticos de 930 estirpes uropatogénicas Gram-negativas.
 AMX – amoxicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; CXM – cefuroxima;
 SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; CIP – ciprofloxacina; FT – nitrofurantoína; FOS – fosfomicina.
 R – resistente; I – intermédio; S – sensível.

Relativamente ao estudo do hospedeiro, 87.5% (n=892) dos indivíduos são mulheres. 64.7% (n=660) dos indivíduos tem idades superiores a 50 anos, e 22.1% (n=225) deste grupo encontra-se na faixa etária dos 71-80 anos (26).

Os factores de risco mais prevalentes são a história de ITUs anteriores (33.1%, n=338), diabetes *mellitus* (16.1%, n=164) e gravidez (8.0%, n=82) (este último valor aumenta para 26.0%, usando um critério de selecção de 11-50 anos de idade, para obter a proporção de mulheres grávidas no grupo de mulheres em idade fértil) (26) (Tabela 9.B).

Tabela 9.B – Prevalência dos factores de risco considerados.

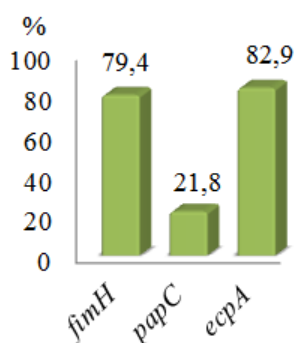
Factor de Risco	Indivíduos	
Pelo menos uma ITU no último ano	338	(33.1%)
Diabéticos	164	(16.1%)
Grávidas	82	(8.0%)
Algaliados	22	(2.2%)
Acamados	22	(2.2%)
Algaliados e acamados	13	(1.3%)

Relativamente ao estudo dos factores de virulência de *Escherichia coli*, foram seleccionadas as amostras de mulheres com idades inferiores a 50 anos sem factores de risco (eliminando a sua interferência, para que os resultados só sejam dependentes dos factores de virulência). Das estirpes estudadas, 49.4% (n=84) possuem os genes *fimH* e *ecpA* e 18.2% (n=31) possuem os genes *fimH*, *ecpA* e *papC*. Em 5.3% (n=9) das estirpes não foi detectado nenhum destes genes (26) (Tabela 9.C).

Tabela 9.C – Frequência de cada uma das combinações possíveis de genes de factores de virulência.

Factores de virulência	Estirpes	
Só <i>fimH</i>	15	(8.8%)
Só <i>ecpA</i>	25	(14.7%)
Só <i>papC</i>	0	(0.0%)
<i>fimH</i> + <i>ecpA</i>	84	(49.4%)
<i>fimH</i> + <i>papC</i>	5	(3.0%)
<i>ecpA</i> + <i>papC</i>	1	(0.6%)
<i>fimH</i> + <i>ecpA</i> + <i>papC</i>	31	(18.2%)
Nenhum	9	(5.3%)

No total, 82.9% (n=141) das estirpes possuem o gene *ecpA* e 79.4% (n=135) possuem o gene *fimH* (26) (Figura 9.H).

**Figura 9.H** – Frequência dos genes de virulência nas 170 estirpes de *Escherichia coli* estudadas.

Mais uma vez, este estudo permite concluir que *Escherichia coli* é o agente uropatogénico mais frequente (seguido de *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp.), verificando-se, no entanto, uma predominância inferior ao estudo anterior, uma vez que no presente foram consideradas também ITUs complicadas (26).

Relativamente ao estudo da susceptibilidade a antibióticos, verifica-se que as resistências mais acentuadas manifestam-se em relação à amoxicilina, cotrimoxazol e ciprofloxacina. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos no estudo anterior (26).

Relativamente ao estudo do hospedeiro, os resultados obtidos apoiam factos conhecidos, incluindo a maior prevalência de ITUs em mulheres, a influência da história clínica de ITUs na recorrência destas infecções, e a maior predisposição dos indivíduos diabéticos, mulheres grávidas e indivíduos algaliados para ITUs (26).

Relativamente ao estudo dos factores de virulência de *Escherichia coli*, o gene mais encontrado foi o gene *ecpA* que codifica para o pilus ECP e é responsável pela adesão de *Escherichia coli* aos enterócitos. Este resultado apoia o facto de a principal via de infecção ser a via ascendente, por bactérias provenientes da flora intestinal. O gene *fimH*, como já foi referido, codifica para as adesinas presentes na extremidade das fímbrias do tipo 1, que medeiam a adesão ao epitélio da bexiga. Como esperado, foi encontrada uma elevada prevalência deste gene nas estirpes estudadas. Uma vez que estas infecções foram consideradas como cistites, não seria de esperar uma elevada prevalência do gene *papC*, pois este codifica para proteínas que constituem um canal transmembranar que participa no transporte e na polimerização das fímbrias P que, por sua vez, estão associadas a pielonefrites. No entanto, é de valorizar a sua presença associada aos genes *ecpA* e *fimH*, chamando a atenção para o facto de estas estirpes, apesar de causarem cistites nestes casos, poderem avançar ao longo do tracto urinário e atingir os rins e causar pielonefrites, com consequências mais graves (26).

10.LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA – HOSPITAL DOS SAMS

Neste laboratório é mantida uma base de dados no sistema automatizado Vitek2 (bioMérieux), que consiste num sistema para identificação de microrganismos e estudo da sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Na base de dados foi efectuada uma pesquisa referente às ITUs diagnosticadas no ano de 2010, em urinas obtidas a partir de jacto médio, saco colector, cateter urinário ou punção supra-púbica, provenientes da comunidade e de lares (30).

Foram testadas 2373 urinas em 2010. *Escherichia coli* foi o agente uropatogénico mais prevalente (72.1%, n=1710), seguido de *Proteus mirabilis* (7.9%, n=188) e *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* (7.2%, n=170) (30) (Figura 10.A).

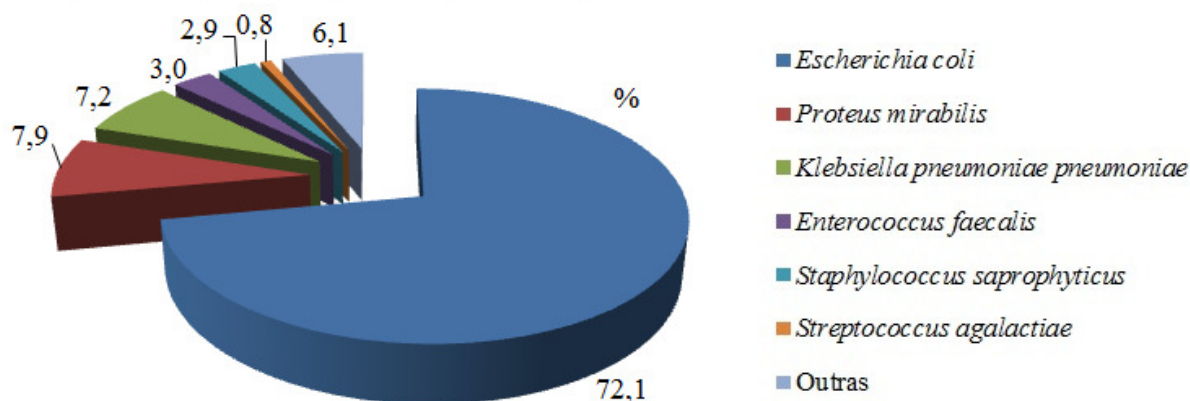


Figura 10.A – Bactérias uropatogénicas isoladas em 2373 urinas em 2010.

81.9% (n=1944) das amostras pertenciam a mulheres (de todas as idades). As restantes 18.1% (n=429) pertenciam a homens (de todas as idades). Em ambos os grupos, *Escherichia coli* é o agente uropatogénico mais prevalente, seguido de *Proteus mirabilis*. Nas mulheres, outro agente importante é *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, enquanto que nos homens são *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* que adquirem uma maior prevalência (30) (Figura 10.B).

33.1% (n=643) das mulheres e 59.0% (n=253 dos homens) apresentam idades superiores a 65 anos. Nestes sub-grupos, *Escherichia coli* mantém-se o agente uropatogénico mais prevalente. No sub-grupo das mulheres verifica-se uma maior predominância de *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* e *Staphylococcus saprophyticus*, enquanto que no sub-grupo dos homens verifica-se uma maior predominância de *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (30) (Figura 10.C).

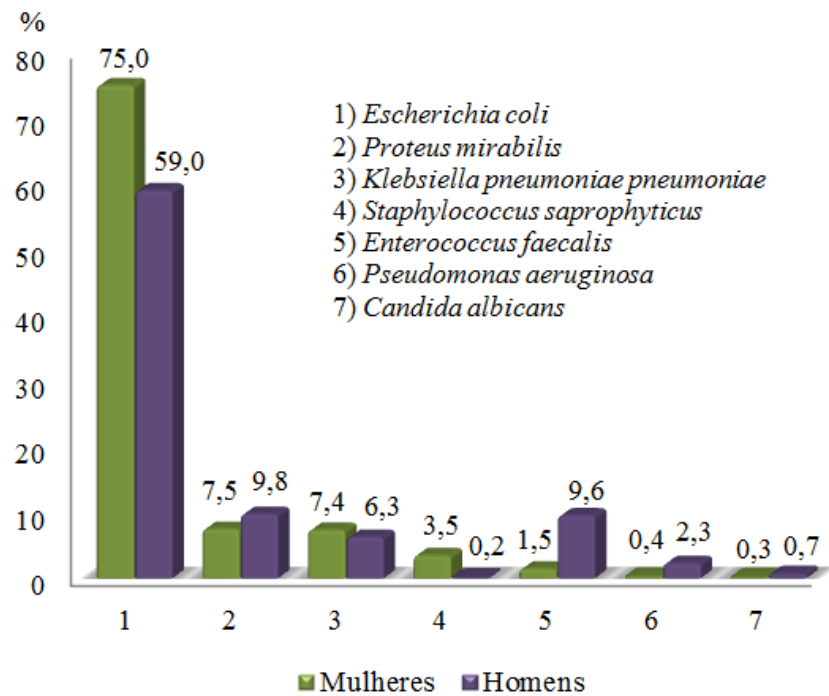


Figura 10.B – Microrganismos isolados em 1944 urinas de mulheres e 429 de homens.

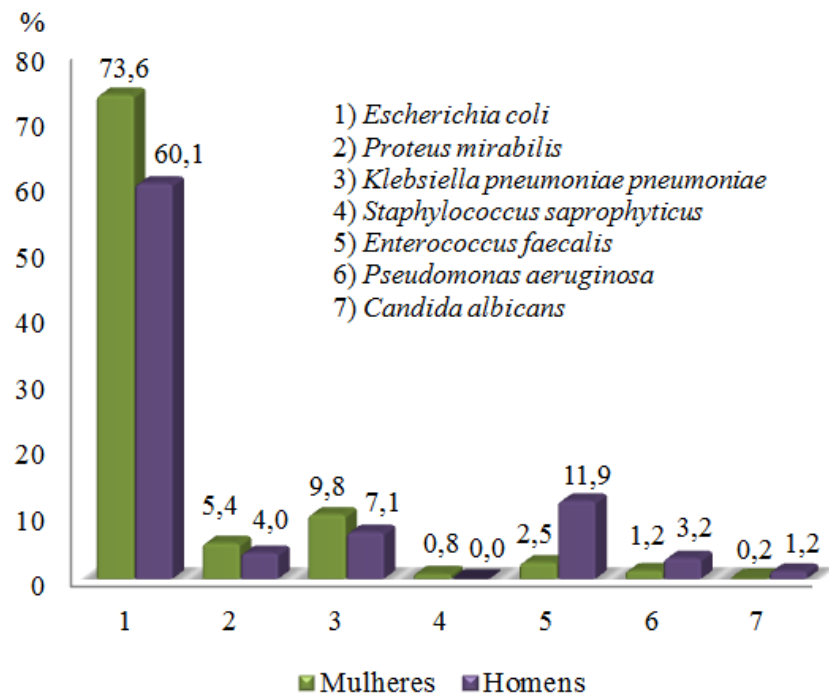


Figura 10.C – Microrganismos isolados em 643 urinas de mulheres e 253 urinas de homens (indivíduos com idades superiores a 65 anos).

Uma pesquisa semelhante foi efectuada relativamente à susceptibilidade aos antibióticos das estirpes de *Escherichia coli* isoladas nestas amostras (30).

Verifica-se que as estirpes isoladas em urinas de mulheres tendem a ser mais sensíveis aos antibióticos testados. No entanto, verifica-se já elevadas percentagens de resistência à ampicilina e cotrimoxazol. As estirpes isoladas de urinas de homens apresentam elevadas percentagens de resistência a todos os antibióticos com excepção da nitrofurantoína, provavelmente por esta não ser aconselhada para o tratamento de ITUs em homens (Figura 10.D). Foram obtidos resultados semelhantes, quando consideradas estirpes de *Escherichia coli* isoladas de urinas de indivíduos com idades superiores a 65 anos (30).

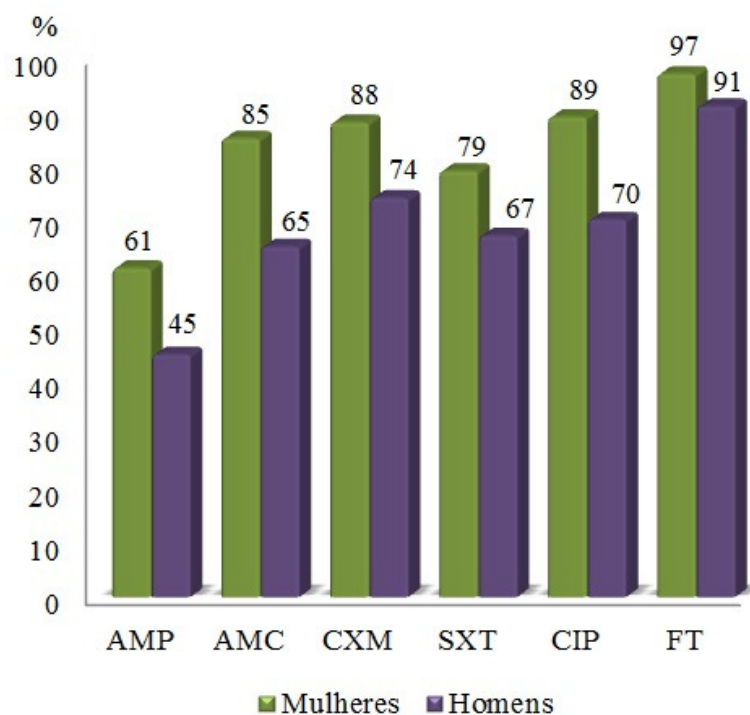


Figura 10.D – Perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* (473 urinas de mulheres e 152 urinas de homens).
 AMX – amoxicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; CXM – cefuroxima;
 SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; CIP – ciprofloxacina; FT – nitrofurantoína.

CONCLUSÃO

As UTIs são as infecções bacterianas mais comuns. Geralmente não são associadas a sequelas a longo prazo, excepto em subpopulações específicas.

O aumento das subpopulações em risco de desenvolvimento de ITUs associado ao conjunto de características dos microrganismos, à pressão selectiva exercida pelas antibióterapias e às condições sociais e tecnológicas que facilitam a transmissão de microrganismos multi-resistentes, conduz ao aumento das resistências às antibióterapias comumente adoptadas.

Escherichia coli mantém-se o agente uropatogénico mais prevalente. O conhecimento dos seus mecanismos de evasão, virulência e persistência no tracto urinário (assim como de outros microrganismos uropatogénicos) pode ser usado para identificar alvos para a sua eliminação, assim como criar novas antibióterapias eficazes que exerçam baixa pressão selectiva.

Vários estudos sobre a interacção hospedeiro-microrganismo permitem uma melhor compreensão da patogénese das ITUs, e o estudo dos mecanismos envolvidos pode conduzir à descoberta de novas vias manipuláveis por fármacos. No que diz respeito às ITUs complicadas, devem ser definidas estratégias de acordo com as anomalias subjacentes do tracto urinário assim como com a influência destas na frequência e no risco de ITU, incluindo a aplicação de terapêuticas não antimicrobianas.

As elevadas resistências das diversas estirpes uropatogénicas estudadas, principalmente em relação à amoxicilina, ao cotrimoxazol e à ciprofloxacina, estão de acordo com dados de vários estudos que referem a importância da utilização da nitrofurantoína, por exemplo, em vez dos antibióticos referidos anteriormente, como estratégia de controlo do aumento das resistências para que estes antibióticos não percam totalmente o seu efeito.

O controlo e a prevenção do aumento das resistências requer a aplicação equilibrada dos antibióticos actualmente em uso, a criação de novos antibióticos, vacinas e outras substâncias, e o correcto aconselhamento dos indivíduos afectados para que cumpram os planos de tratamento delineados.

BIBLIOGRAFIA

1. ARTIGOS

1. Anderson G, Martin S, Hultgren S. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect.* 2004;6:1094-101
2. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.* 2002;(1A):5S-13S
3. Najjar M, Saldanha C, Banday K. Approach to urinary tract infections. *Indian J Nephrol.* 2009;19(4):129-39
4. Hunstad D, Justice S. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 2001;64:203-21
5. Moura A, Nicolau A, Hooton T, Azeredo J. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *J Appl Microbiol.* 2009;106:1779-91
6. Wagenlehner F, Naber K. Treatment of bacterial urinary tract infections: presence and future. *Eur Urol.* 2006;49:235-44
7. Hooton T, Besser R, Foxman B, Fritsche T, Nicolle L. Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empirical therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;39:75-80
8. Rahn D. Urinary tract infections: contemporary management. *Urol Nurs.* 2008;28(5):333-41
9. Nicolle L. A practical guide to antimicrobial management of complicated urinary tract infection. *Drugs Aging.* 2001;18:243-54
10. Zorc J, Kiddoo D, Shaw K. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infections. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):417-22
11. Chen S, Jackson S, Boyko E. Diabetes mellitus and urinary tract infection: epidemiology, pathogenesis and proposed studies in animal models. *J Urol.* 2009;182:S51-6
12. Schönwald S, Begovac J, Skerk V. Urinary tract infections in HIV disease. *Int J Antimicro Ag.* 1999;11:309-11
13. Cardenas D, Hooton T. Urinary tract infection in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995;76:272-80
14. Naber K. Treatment options for acute uncomplicated cystitis in adults. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(S1):23-7

15. Johnson J. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews 1991;4:80-128
16. Hooton T. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. J Antimicrob Chemother. 2000;46(S1):1-7
17. Siroki M. Pathogenesis of bacteriuria and infection in the spinal cord injured patient. Am J Med. 2002;113(1A):67S-79S
18. Warren J. Catheter-associated urinary tract infections. Int J Antimicro Ag. 2001;17:299-303
19. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. Am J Med. 2002;113(1A):14S-19S
20. Schilling J, Mulvey M, Hultgren S. Dynamic interactions between host and pathogen during acute urinary tract infections. Urology. 2001;57(6A):56-61
21. Song J, Abraham S. Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. Eur J Clin Invest. 2008;38(S2):21-8
22. Scherberich J, Hartinger A. Impact of toll-like receptor signaling on urinary tract infection. Int J Antimicro Ag. 2008;31S:S9-14
23. Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS project. J Antimicrob Chemother. 2003;51:69-76
24. Silva A, Machado P, Rodrigues V, Duarte A. Bactérias uropatogénicas identificadas de cistites não complicadas de mulheres na comunidade. Acta Urol. 2008;3:9-14
25. Narciso A, Fonseca F, Cerqueira S, Duarte A. Suscetibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010. Acta Urol. 2011;1:16-21
26. Narciso A, Eusébio A, Fonseca F. Bactérias uropatogénicas na comunidade em 2010: estudo multicêntrico. Aceite para publicação na Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas

2. LIVROS

27. Pinto A. Fisiopatologia – Fundamentos e Aplicações. Lidel; 2009. p. 352-4
28. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 82-87
29. Wicker M, Bush K, Cockerill F. Performance standards for antimicrobial testing; eighteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008

3. OUTROS

30. Compilação de dados relativos a ITUs da comunidade em 2010, fornecida pela Dr^a Maria Luísa Gonçalves do Laboratório de Microbiologia do Hospital dos SAMS